

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Ernst Schütte

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE OXIDATION VON
17~~β~~-OESTRADIOL ZU OESTRON BEI RATTEN IN VIVO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hella Kleucker
aus Bernstadt Krs. Oels (Schlesien)

1969

Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Freien Universität
Berlin

Direktor: Professor Dr.med. Dr.rer.nat. Ernst S c h ü t t e

Untersuchungen über die Oxidation
von 17 β -Oestradiol zu Oestron bei Ratten in vivo

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hella Kleucker
aus Bernstadt Krs.Oels (Schlesien)

Dekan: Professor Dr.med. Herbert L a x

Referent: Professor Dipl.Chem. Dr.rer.nat. Martin W e n z e l

Korreferent: Professor Dr.med. Hans H e r k e n



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am 22.12.1969

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung und Problemstellung.....	1
I. Biologische Wirkungen und Stoffwechsel der Oestrogene.....	5
II. Bestimmung der Oxidationsgeschwindigkeit des Oestradiols zu Oestron durch Radioaktivitäts- messung im Harn.....	9
1. Unterschiede der HTO-Ausscheidung nach Injektion von Oestradiol- 17α -T bei männlichen und weiblichen Ratten.....	11
2. Einfluß einer Primobolan-Vorbehandlung.....	12
3. Einfluß einer Progesteron-Vorbehandlung.....	12
4. Einfluß von Progesteron auf die HTO-Bildung aus Glycerin-2-T.....	16
III. Bestimmung der Oxidationsgeschwindigkeit des Oestradiols zu Oestron durch Radioaktivitäts- messung im Ausatmungswasser.....	19
1. Aufbau einer Apparatur zum Auffangen des Ausatmungswassers von Versuchstieren.....	19
2. Oxidationsgeschwindigkeit von Oestradiol bei weiblichen Ratten.....	24
3. Einfluß einer Progesteron-Vorbehandlung.....	25
4. Wirkung von Progesteron auf die Ausscheidung von Oestradiol und seinen Metaboliten im Harn.	26
5. Einflüsse des Zyklus.....	27
6. Oxidationsgeschwindigkeit des Oestradiols bei Jungtieren und Überprüfung des Primobolan- Einflusses.....	31
7. Vorbehandlung mit Thyroxin.....	33
8. Versuch über die Oxidationsgeschwindigkeit des Oestradiols bei Mäusen mit Mamma-Tumoren.....	34
IV. Diskussion.....	38



Digitized by the Internet Archive
in 2026

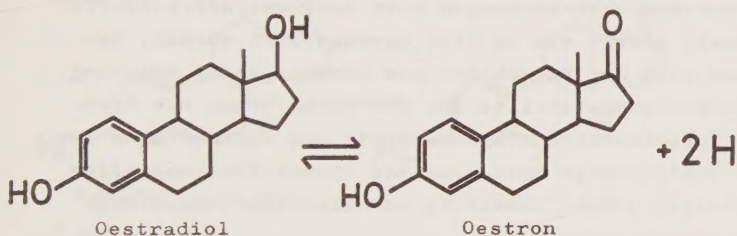
https://archive.org/details/IA41550821_0094

V.Methodik	44
1.Versuchstiere	44
2.Injektionslösungen	44
3.Applikation	46
4.Sammeln des Harns	47
5.Destillation des Harns	47
6.Radioaktivitätsbestimmungen	47
7.Gewinnung des Ausatmungswassers	48
8.Bestimmung der Zyklusphase	49
9.Berechnung der Oestradiol-Oxidation	50
VI.Zusammenfassung	51
VII.Literatur	52

Einleitung und Problemstellung

Für die Ausbildung der Genitalorgane und für die physiologische Regulation der Sexualfunktionen im weiblichen Organismus spielen die Oestrogene die entscheidende Rolle.

Von den natürlichen Oestrogenen hat Oestradiol-17 β die höchste biologische Aktivität. Sowohl lokal als auch parenteral verabfolgt, ruft es die stärksten Veränderungen im Sinne einer östrogenen Stimulation hervor. Bei Inkubation mit Gewebsschnitten oder -homogenaten und im Ganztier wird es jedoch rasch zu Oestron oxidiert, das nur etwa ein Zehntel der biologischen Aktivität des Oestradiols besitzt. Dabei stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der reduzierten und der oxidierten Form des Hormons ein [Formelschema 1].



Oestradiol

Oestron

Formelschema 1

In vitro ist die Oxidation des Oestradiols zu Oestron durch 17 β -Oestradiol-Dehydrogenase in vielen Organen beschrieben worden, so von Ryan und Engel [1] in Leber, Mamma, Placenta und Ileum von Ratten, von Gray und Bischoff [2] in Erythrocyten, von Tomkins [3] in der Leber, von Levitz et al. [4] und von Pearlman et al. [5] in Placentagewebe. Die Leber scheint jedoch im nicht-graviden Organismus die Hauptrolle im Oestradiolstoffwechsel zu spielen.

In vivo haben Beer und Gallagher [6] bei Frauen nach Injektion von Oestradiol-17 β Ausscheidung von Oestron im Harn beobachtet. Oakey et al. [7] fanden bei weib-

lichen Ratten im Blut wenige Minuten nach Injektion von 17 β -Oestradiol-16-¹⁴C steigende Mengen von Radioaktivität in der Oestronfraktion. Jedoch konnten im Ganzen nur 2% der injizierten Radioaktivität wiedergefunden werden. Fishman et al. [8] fanden bei Menschen nach Applikation von Oestron-16-¹⁴C und 17 β -Oestradiol-6,7-T in verschiedenem Verhältnis und Bestimmung des Isotopverhältnisses in der Oestradiol- und Oestronfraktion aus dem Harn, daß die Oxidation des 17-Hydroxysteroids zum 17-Ketosteroid sehr viel schneller vor sich ging als die Rückreduktion. Oestriol und andere schwächer östrogen wirkende Metabolite wurden aus Oestron gebildet, nicht aus Oestradiol, so daß man die Oxidation des Oestradiols zu Oestron als den ersten Schritt in der physiologischen Inaktivierung ansehen kann.

Die meisten Untersuchungen über den Oestradiol-Stoffwechsel, soweit sie in vivo durchgeführt wurden, bedienen sich der Extraktion und nachfolgenden Trennung der Oestrogenmetabolite aus dem Harn. Wegen der Vielzahl verschiedener Steroidsulfate und -glucuronide ist eine vollständige Erfassung und Identifizierung aller Metabolite jedoch schwierig und ziemlich langwierig.

In neueren Arbeiten werden häufig isotopt-markierte Verbindungen für Stoffwechseluntersuchungen verwendet. Meist wird angestrebt, daß das Isotop im Molekül verbleibt um dessen Weg im Körper anzuzeigen und die Umwandlungsprodukte zu kennzeichnen. Ihre Abtrennung und Identifizierung bleibt mühsam.

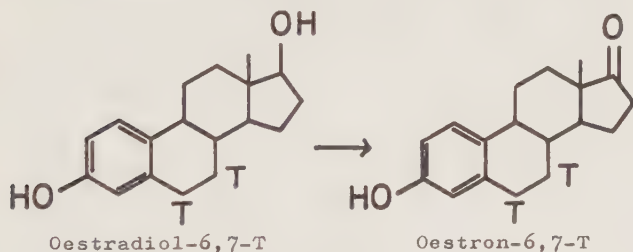
So haben zum Beispiel Fishman et al. [9] Frauen 17 β -Oestradiol-17 α -T injiziert und aus dem Harn Oestradiol, Oestron, Oestriol und Pregnanolon isoliert und deren Gehalt an Radioaktivität gemessen. Der geringe Prozentsatz wiedergefundener Aktivität zeigte, daß Oestradiol zum großen Teil zu Oestron oxidiert worden war und dabei die Radioaktivität abgegeben hatte.

Außerdem bestimmten die Autoren aber den Tritium-Gehalt

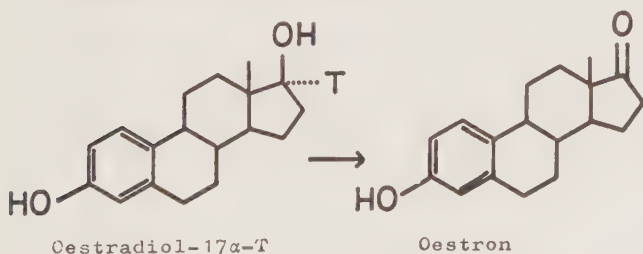
des Blutplasma-Wassers und fanden hier bereits kurze Zeit nach Applikation der markierten Verbindung den größten Teil der eingesetzten Radioaktivität, ohne jedoch die Zeitabhängigkeit und das Ausmaß der Oestradiol-Oxidation näher zu untersuchen.

Bei der Markierung von Oestradiol-17 β in 17 α -Stellung mit Tritium haben wir eine vom bisher bei Untersuchungen über Steroidhormone üblichen abweichende Art der Markierung vor uns: Das radioaktive Isotop, in diesem Falle Tritium, wird bei der Oxidation im Organismus aus dem Molekül eliminiert. Es zeigt dann zwar nicht mehr den weiteren Weg der untersuchten Substanz im Körper an, aber es ermöglicht Aussagen über die Geschwindigkeit der Oxidation.

Formelschema 2 macht den Unterschied zwischen der übli-



a] Übliche Art der Markierung: Tritium verbleibt beim Stoffwechsel im Molekül.



b] Prinzip der 17 α -T-Markierung: Tritium wird bei der Oxidation [Apoenzym: Oestradiol-Dehydrogenase] aus dem Molekül eliminiert.

chen und der hier verwendeten Art der Markierung deutlich: Oestradiol-6,7-T behält das Isotop bei allen im Stoffwechsel vorkommenden Reaktionen, bei Markierung am C₁₇ wird dagegen das Tritium bei der Oxidation des Oestradiols zu Oestron aus dem Molekül entfernt. Die für diese Reaktion verantwortliche 17 β -Oestradiol-Dehydrogenase erfordert als Wasserstoff-Akzeptor DPN oder TPN. Tritium geht also auf eines der Pyridinnucleotide über unter Bildung von DPN-T bzw. TPN-T. Dieses wird über die Atmungskette schnell zu DPN bzw. TPN und HTO oxidiert. Tritiumwasser findet sich dann im Körperwasser.

Nutzt man diese Möglichkeit, ein radioaktives Isotop als Indikator für einen Reaktionsablauf zu verwenden, durch fortlaufende Messung des Anstiegs der Tritium-Konzentration im Körperwasser nach Injektion einer in dieser Weise stoffwechsel-"labil" markierten Verbindung aus, so gewinnt man ein Maß für die Geschwindigkeit der Oxidation im Körper.

Dieses Prinzip wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet. 17 β -Oestradiol-17 α -T wurde Ratten injiziert und der Radioaktivitätsgehalt des Körperwassers fortlaufend bestimmt und sein Anstieg in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Für diese Aufgabe mußte eine Methode entwickelt werden, die eine einfache und genaue Bestimmung des Ablaufes der Oxidation erlaubt. Mit Hilfe dieser Methode sollten Einflüsse anderer Hormone sowie durch Oestrogenwirkung bedingter physiologischer und pathologischer Zustände des Organismus auf die Geschwindigkeit der Oestradiol-Oxidation an Ratten untersucht werden.

Biologische Wirkungen und Stoffwechsel der Oestrogene

Oestrogene werden vom Ovar synthetisiert und sezerniert, jedoch nicht gespeichert. Als Produktionsort wird allgemein die theca interna des reifen Graafschen Follikels angenommen. Geringere Mengen von Oestrogenen stammen auch aus der Nebennierenrinde.

Wachstum, Reifung und Untergang der Follikel bewirken zyklischen Anstieg und Abfall der Oestrogenproduktion und damit des Oestrogengehaltes im Blut und der Oestrogenausscheidung im Harn. Für den Menschen berechnete Brown [10] folgende Sekretionsraten:

	µg Oestradiol und/oder Oestron pro 24 Stunden
Proliferationsphase	80 - 100
Ovulationsmaximum	250 - 350
Lutealphase	100 - 250

Diese Werte stimmen mit den von anderen Autoren angegebenen überein [11].

Art und Dauer des Zyklus ebenso wie Stoffwechsel und Inaktivierung der Oestrogene zeigen starke Speciesunterschiede. Hier soll im wesentlichen auf die Verhältnisse bei Ratten eingegangen werden. Das Rattenweibchen hat kontinuierliche, keinen jahreszeitlichen Schwankungen unterliegende Zyklen und dementsprechend das ganze Jahr über gleichbleibende Fertilität. Die Dauer eines Zyklus beträgt 4 - 5 Tage. Während des Oestrus, der 13 - 15 Stunden dauert, kommt es spontan zur Ovulation, jedoch bildet sich ein funktionsfähiges corpus luteum nur nach vollzogener Kopulation aus.

Die biologischen Wirkungen der Oestrogene umfassen neben direkten Einflüssen auf die Genitalorgane auch die Ausprägung sekundärer weiblicher Geschlechtsmerkmale und allgemeine Wirkungen auf den Stoffwechsel. Uterus, Tuben und Vagina hypertrophieren unter vermehrter Wassereinlagerung. Am Vaginalepithel der Nager führen Oestrogene zu Proliferation und Verhornung.

Oestrogene werden, wie auch andere Steroidhormone, in der Leber durch Konjugierung, z. B. mit Schwefel- oder Glucuronsäure, und durch Bildung nicht-phenolischer Metabolite inaktiviert. Im Herz-Lungen-Präparat fanden Israel et al. [12] und Schiller [13] keine Inaktivierung. Blieb aber die Leber mit in den Kreislauf eingeschaltet, so beobachteten Zondek und Sklow [14] eine vollständige Inaktivierung des durchströmenden Oestrone, auch nach selektiver Zerstörung des reticulo-endothelialen Systems der Leber, das demnach keine entscheidende Funktion in der Oestrogen-Inaktivierung zu haben scheint. Niere, Milz und Herzmuskel inaktivieren in vitro Oestrogene nicht, während die Konjugierung in der Darmwand möglich zu sein scheint.

Die Konjugierung mit Schwefel- oder Glucuronsäure kann in 3- oder 17-Stellung erfolgen, bei Oestriol auch in 16-Stellung. Es entstehen Produkte wie Oestrone-sulfat oder Oestriolglucuronid, um zwei Beispiele zu nennen. Die konjugierten Metabolite werden vorwiegend mit dem Harn ausgeschieden, nur ein geringer Teil findet sich in den faeces. Zwar werden Oestrogene in der Galle angereichert und mit dieser vermehrt in den Darm ausgeschieden, doch unterliegen sie einem enterohepatischen Kreislauf [15]: sie werden aus dem Darm wieder resorbiert und erneut der Leber zugeführt, so daß letzten Endes kaum östrogene Aktivität im Stuhl nachweisbar ist [6].

Zu den östrogenen Wirkstoffen gehört eine große Gruppe von Substanzen, sowohl natürliche wie synthetische, jedoch sind am wirksamsten 17 β -Oestradiol und Oestron. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Wirksamkeit verschiedener natürlicher Oestrogene.

Oestradiol und Oestron können im Organismus leicht ineinander übergeführt werden [vgl. S. 1]. Die Bedeutung dieser Oxidation und Reduktion ist vielfach untersucht worden. Villee [50] konnte aus Placentagewebe eine DPN- und eine TPN-abhängige 17 β -Oestradiol-Dehydrogenase isolieren. Während er beide Enzyme getrennt

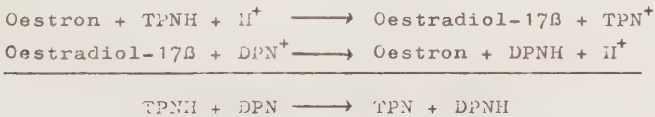
Tabelle 1

Wirksamkeit verschiedener Oestrogene im Vaginal-
verhornungstest bei Ratten

Die Wirksamkeit des 17 β -Oestradiols ist gleich 1
gesetzt. Nach [11].

Oestradiol-17 β	1
Oestradiol-17 α	1/40
Oestron	1/2 - 1/10
16-Ketoöstron	1/20 - 1/30
6-Keto-17 β -Oestradiol	1/4
Oestriol	1/40 - 1/100

aktivieren und hemmen und elektrophoretisch und chromatographisch trennen konnte, postulieren Talalay und Williams-Ashman [16] ein einheitliches System, das sowohl durch DPN als auch durch TPN aktiviert werden und durch abwechselnde Oxidation und Reduktion des Oestradiols als Transhydrogenase Wasserstoff zwischen den Pyridinnucleotiden übertragen soll nach folgendem Schema:



Diese Transhydrogenasewirkung beobachteten auch Jarabak et al. [17] in der Placenta. Dagegen fand Bloom [19] bei Inkubation von Leberschnitten mit einem DPN-T-liefernden System keinen Unterschied in der Tritium-Verteilung in Wasser, Lipiden und Glycogen bei Anwesenheit oder Fehlen von Oestradiol, so daß er eine regulatorische Funktion des Oestradiols bei der Wasserstoffübertragung aus DPNH ablehnt.

Physiologische Bedeutung für die hormonale Wirkung der Oestrogene mißt auch Williams-Ashman der Transhydrogenase-Funktion nicht zu [20], denn es findet sich keine Korrelation zwischen der biologischen Wirksam-

keit verschiedener auch synthetischer Oestrogene und ihrer Fähigkeit, die Transhydrogenase zu aktivieren, im Gegenteil: Stilböstrol hemmt die 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase aus menschlicher Placenta [18], während es in den biologischen Tests qualitativ gleich wirkt wie Oestradiol und Oestron.

Bestimmung der Oxidationsgeschwindigkeit des
Oestradiols zu Oestron durch Radioaktivitätsmessung
im Harn.

Die Oxidationsgeschwindigkeit von injiziertem 17β -Oestradiol- 17α -T zu Oestron sollte bei Ratten durch Messen der HTO-Konzentration im Körperwasser untersucht werden. Zunächst bot sich als einfachste Möglichkeit, die spezifische Aktivität des Körperwassers zu messen, die Destillation des Harns und Bestimmung des Tritium-Gehaltes im Wasser an.

Die Ratten bekamen jeweils $25\ \mu\text{Ci}$, entsprechend $40\ \mu\text{g}$ 17β -Oestradiol- 17α -T intramuskulär injiziert. Durch Druck von außen auf die Harnblase wurde eine Harnentleerung provoziert, um eine Verfälschung des Ergebnisses durch schon vor der Injektion des radioaktiven Materials produzierten Harn zu vermeiden. Dann wurden die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfige gesetzt [s. Abb. 1] und der Harn gesammelt.



Abbildung 1
Stoffwechselkäfig zum Sammeln des Harns

Es wurde jeweils die gesamte im Harn pro 24 Stunden ausgeschiedene Tritiummenge bestimmt, wobei eine im Durchschnitt gleichmäßige Harnmenge, bezogen auf das Körpergewicht, bei allen Tieren angenommen wurde. Außerdem wurde der Harn destilliert und die Radioaktivität des Destillats gemessen, um den Anteil HTO an der gesamten ausgeschiedenen Aktivität zu bestimmen. Die Werte waren jedoch kaum unterschiedlich, wie Tabelle 2 zeigt, d. h. es wurde fast keine tritiumhaltige Festsubstanz ausgeschieden. Außerdem geht aus der Tabelle hervor, daß die Fehlergrenze sehr groß ist. Als Fehlerquellen kommen im wesentlichen folgende in Betracht:

1. Beim Harnsammeln ist der Verlust durch Verdunsten auf dem langen Weg von der Ratte bis ins Gefäß beträchtlich.
2. Durch Trinkwasser und Futterkrümel wird der Harn verunreinigt.
3. Die Harnmenge kann individuellen Schwankungen unterliegen.

Tabelle 2

Tritium-Ausscheidung im 24-Stunden-Harn weiblicher Ratten nach Injektion von 17β -Oestradiol- 17α -T.

Injizierte Menge: 25 μ Ci/Ratte. Tritium-Aktivität im Gesamtharn und im Harndestillat in Prozent der injizierten Aktivität. Mittelwerte von drei Tieren.

Tage nach Inj.	Gesamtharn % d. Akt.	Harndestillat % d. Akt.
1	2,30 $\pm$ 0,75	2,60 $\pm$ 0,60
2	1,94 $\pm$ 0,39	2,11 $\pm$ 0,60
3	1,61 $\pm$ 0,80	1,44 $\pm$ 0,86
4 + 5	1,53 $\pm$ 0,37	1,59 $\pm$ 0,51
6 + 7	0,87 $\pm$ 0,48	0,87 $\pm$ 0,51
8 + 9	0,39 $\pm$ 0,13	0,29 $\pm$ 0,15
10 + 11	0,66 $\pm$ 0,23	0,68 $\pm$ 0,38

1. Unterschiede der HTO-Ausscheidung nach Injektion von 17β -Oestradiol- 17α -T bei männlichen und weiblichen Ratten.

Bei einem Sexualhormon konnte eine unterschiedliche Inaktivierungsrate und damit vielleicht auch eine verschiedene Oestradiol-Oxidationsgeschwindigkeit bei Männchen und Weibchen erwartet werden. Deswegen bekamen zunächst je drei geschlechtsreife männliche und weibliche Ratten sowie drei weibliche infantile Jungtiere 17β -Oestradiol- 17α -T injiziert. Erwachsene Weibchen schieden in den ersten drei Tagen 6 % der injizierten Aktivität als HTO im Harn aus, Männchen und Jungtiere nur 3 %. Die tägliche Ausscheidung ist in Abbildung 2 dargestellt. Über die Bewertung der Ergebnisse s.u. Seite 31.

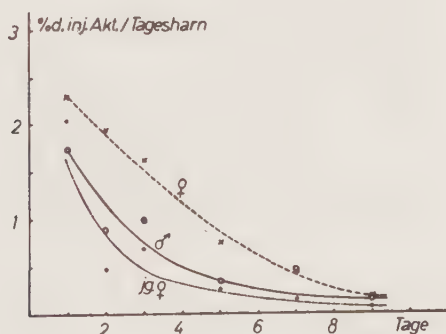


Abbildung 2

Tritium-Ausscheidung im 24-Stunden-Harn von Ratten nach Injektion von Oestradiol- 17α -T.

Eingesetzte Aktivität: 25 μ Ci/ Ratte.

Angaben in Prozent der eingesetzten Aktivität.

Mittelwerte von je drei Tieren:

- erwachsene Männchen
- x--x- erwachsene Weibchen
-• infantile Weibchen

2. Einfluß einer Primobolan-Vorbehandlung

Primobolan [1-Methyl- Δ^1 -androstenolonazetat] als anaboles Hormon aktiviert im Stoffwechsel vor allem den Aufbau körpereigener Substanz. Synthese bedeutet in Bezug auf Wasserstoff Reduktion statt Verbrennung zu Wasser. Anabole Hormone müßten daher zu einer verminderten HTO-Bildung führen und stattdessen zu einem Einbau des Tritiums in Zellbestandteile.

Um eine solche Wirkung nachzuprüfen, erhielten männliche und weibliche Ratten nach 14tägiger Vorbehandlung mit Primobolan 17 β -Oestradiol-17 α -T. Der Harn der folgenden drei Tage wurde gesammelt und die gesamte ausgeschiedene Aktivität bestimmt.

Bei Weibchen hatte die Vorbehandlung keinen Einfluß auf die HTO-Ausscheidung. Bei Männchen und männlichen Jung-Tieren zeigte sich jedoch im Gegensatz zu der oben angeführten Hypothese über die Wirkung der Anabolika in Bezug auf den Wasserstoff eine erheblich vermehrte HTO-Ausscheidung. Sie erreichte die Werte, die auch für weibliche Tiere ermittelt wurden. Allerdings war die Schwankungsbreite aus den bereits auf Seite 10 dargestellten Gründen erheblich. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt. Später wurde der Versuch mit verbesserter Methodik wiederholt. Die Ergebnisse werden auf Seite 31 diskutiert.

3. Einfluß einer Progesteron-Vorbehandlung

An der Ausprägung des weiblichen Somatotyps und am Wachstum und den funktionellen Veränderungen der weiblichen Geschlechtsorgane ist neben den Oestrogenen auch Progesteron maßgeblich beteiligt. So kommt es zur Ausbildung eines implantationsbereiten Endometrium ebenso wie zu Wachstum und regelrechter Differenzierung des Brustdrüsengewebes nur unter kombinierter Wirkung beider Hormone.

Außer diesen synergistischen und modifizierenden Wirkungen hat Progesteron aber auch antagonistische Wirkungen, die bei gleichzeitiger Injektion von Oestradiol und Progesteron stark von der Dosis und vom Verhältnis des Oestrogen- und Progesteronanteils abhängig sind. In geeigneten Dosen hemmt Progesteron die östrogeninduzierte Hypertrophie des Uterus [21] und die Verhornung des Vaginalepithels.

Neben der biologischen antiöstrogenen Wirkung des Progesterons wurde auch eine antagonistische Wirkung auf Enzyme beschrieben. Progesteron hemmt die östrogene Stimulierung der DPNH-Oxidase im Uterus [22, 23]. Jedoch fanden andere Autoren in vivo keinen Einfluß des Progesterons auf den Oestradiol-Stoffwechsel. Heard et al. [24] injizierten Kaninchen 17β -Oestradiol und fanden bei gleichzeitiger Applikation von Progesteron keinen Unterschied der Oestrogenausscheidung im Harn.

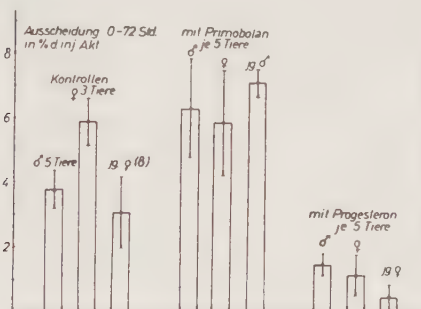


Abbildung 3

Einfluß von Primobolan und von Progesteron auf die ATE-Ausscheidung nach Injektion von Oestradiol- 17α -T. Tritium-Aktivität im Marndestillat 0-72 Stunden nach Injektion in Prozent der injizierten Aktivität [25 μ Ci/ Ratte]. Mittelwerte.

Endahl und Kochakian [25] fanden *in vitro* eine Hemmung der DPNH-Oxidation durch Progesteron und andere Steroidhormone, die *in vivo* bei Mäusen nicht auftrat.

Bei den in Abbildung 3 dargestellten Versuchen schieden weibliche Ratten nach Progesteron-Vorbehandlung nur etwa ein Fünftel soviel HTO im 24-Stunden-Harn aus, wie unvorbehandelte Weibchen. Das schien eine Hemmung der Oestradiol-Oxidation durch Progesteron anzuzeigen. Aus einem weiteren Versuch ging allerdings hervor, daß Progesteron die Diurese im Sinne einer Wasserretention beeinflußt, so daß mit geringerer Harnmenge natürlich auch weniger HTO ausgeschieden wird. Wie Tabelle 3 zeigt, wurde die Harnmenge im Durchschnitt um $1/3 - 1/2$ reduziert. Bei geringerer Harnmenge ist aber auch der Fehler durch Verlust beim Auffangen des Harns viel größer, so daß das Ergebnis des Versuchs mit großer Zurückhaltung bewertet werden muß.

Tabelle 3

Reduktion der Harnmenge durch Progesteron-Behandlung

Harnmenge [ml] nach Injektion von Oestradiol bei weiblichen Ratten mit und ohne Progesteron-Vorbehandlung. Mittelwerte von je vier Tieren.

Stunden	0-1/2 [ml]	1/2-1 [ml]	1-2 [ml]	2-4 [ml]	4-6 [ml]	24-26 [ml]
mit Progesteron	1,1	1,2	1,7	0,7	0,4	4,4
Kontrollen	1,8	2,4	2,4	1,4	0,5	5,3

Um diesen Fehler zu vermeiden, wurde in den weiteren Versuchen nicht mehr die Gesamtausscheidung von Tritium in 24 Stunden gemessen, sondern die Tritiumkonzentration im Harn zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Tiere wurden jeweils nur einige Stunden in die Stoffwechselkäfige gesetzt unter Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz, um die Verunreinigung des Harns mit Futterkrümeln und Trinkwasser zu vermeiden. Dann wurde die Radioaktivität pro

ml Harn und pro ml Harndestillat bestimmt. Die Ergebnisse wurden dargestellt in Prozent der injizierten Aktivität pro ml Harn, wobei als 100% die injizierte Aktivität pro Gramm Ratte gesetzt wurde, um außer dem Harnvolumen auch das verschiedene Körpergewicht der Tiere zu eliminieren.

Bei dieser Art der Auswertung zeigten in einem weiteren Versuch Progesteron-vorbehandelte Tiere und Kontrollen nur wenig voneinander abweichende Werte [Tabelle 4], jedoch genügte die geringe Anzahl von Meßpunkten nicht für eine gesicherte Aussage.

Tabelle 4

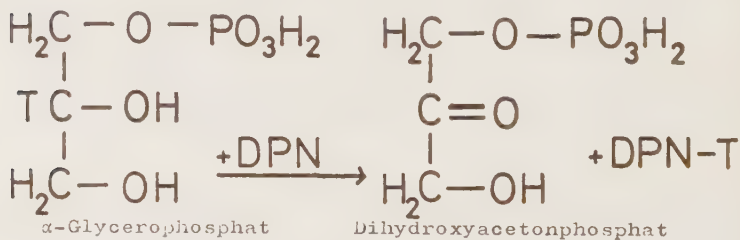
Einfluß von Progesteron auf die HFO-Bildung aus
17 β -Oestradiol-17 α -T

Vorbehandlung mit Progesteron 3mal jeden 2. Tag 5 mg/kg i.m. Danach Injektion von 30 μ Ci Oestradiol-17 α -T pro Ratte. Tritium-Konzentration im Harn und im Harndestillat in Prozent der Aktivität pro ml Harn. 100% = inj. Akt. pro g Ratte.
Mittelwerte von je 5 Tieren.

Std. n. Inj.	Weibchen mit Progesteron-Vorbeh.	
	Gesamtharn %	Destillat %
0 - 7	80,5 $\pm$ 23,7	53,0 $\pm$ 16,4
24 - 30	109,5 $\pm$ 11,5	94,5 $\pm$ 5,6
72 - 78	88,0 $\pm$ 12,0	
9 Tage	45,3 $\pm$ 9,5	
	Weibchen ohne Vorbehandlung	
0 - 7	94,3 $\pm$ 8,1	77,5 $\pm$ 11,3
24 - 30	109,8 $\pm$ 6,6	
48 - 54	36,6 $\pm$ 1,6	

4. Einfluß von Progesteron auf die HTO-Bildung aus Glycerin-2-T

Wenn Progesteron, wie das Yielding et al. [23] und Bever [22] angeben, die DPNH-Oxidation über die Atmungskette hemmt, so könnte eine langsamere HTO-Bildung aus Oestradiol-17 α -T nach Progesteron-Vorbehandlung, wie sie der oben beschriebene Versuch [s.S. 13] anzuzeigen schien, auch ohne Beeinflussung der Oxidationsgeschwindigkeit des Oestradiols durch Verlangsamung der HTO-Bildung aus DPN-T zustandekommen. Um einen solchen Einfluß nachzuprüfen, sollte ein im Stoffwechsel DPN-T-lieferndes System verwendet werden. Durch Vergleich des Anstiegs der Tritium-Konzentration im Körperwasser bei Progesteron-behandelten und unbehandelten Tieren mußte sich dann gegebenenfalls ein Einfluß des Progesterons auf die HTO-Bildung aus DPN-T zeigen. Für diesen Zweck wurde Glycerin-2-T verwendet. Es gibt im Stoffwechsel bei der Oxidation des α -Glycerophosphats zu Dihydroxyacetonphosphat das Tritium-Atom an DPN ab, so daß DPN-T entsteht, das wiederum über die Atmungskette HTO bildet [Formelschema 3]. Bezüglich einer anderen Möglichkeit der HTO-Bildung aus Glycerin-2-T vgl. S. 43.



Formelschema 3

Bei Progesteron-vorbehandelten weiblichen Ratten und einer Kontrollgruppe, die Glycerin-2-T injiziert bekamen, zeigte sich, wie in Abbildung 4 dargestellt ist, kein wesentlicher Unterschied in der HTO-Ausscheidung

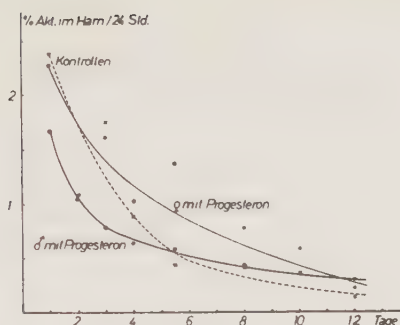


Abbildung 4

Einfluß von Progesteron auf die HTO-Ausscheidung nach Injektion von Glycerin-2-T.

Tritium-Aktivität im Destillat des 24-Stunden-Harns in Prozent der eingesetzten Aktivität [30 μ Ci/Ratte]. Mittelwerte von je 5 Tieren.

im Harn. Jedoch war am ersten Tag nach der Injektion die Differenz der Aktivität im Gesamtharn und im Destillat erheblich, d.h. es wurde unabgebautes Glycerin oder Zwischenprodukte ausgeschieden [Tabelle 5].

Tabelle 5

Ausscheidung von Glycerin-2-T und von HTO im Harn nach Injektion von Glycerin-2-T.

Tritium-Konzentration im Harn und im Harndestillat in Prozent der inj. Akt. pro ml. 100% = Akt/g Ratte. Mittelwerte von je 6 Tieren.

Zeit n.I.	unbehandelt		Progesteron-Vorbeh.	
	Gesamtharn % Akt.	Destillat % Akt.	Gesamtharn % Akt.	Destillat % Akt.
1	152	113	159	94
2	120	115	120	107
3	111	104	104	97
8	56	56	46	46

Der Versuch wurde mit verbesserter Methodik wiederholt und die HTO-Konzentration im Harn bestimmt. Das Ergebnis ist jedoch, wie aus Abbildung 5 hervorgeht, das gleiche: Progesteron hat keinen hemmenden Einfluß auf die Geschwindigkeit der HTO-Bildung aus Glycerin-2-T, eher verläuft diese sogar etwas schneller als bei den Kontrollen.

Ein Vergleich der beiden Abbildungen [4 und 5] zeigt deutlich die kleineren Fehlergrenzen bei der Konzentrationsbestimmung [Abb. 5] gegenüber der Messung der Gesamtausscheidung [Abb. 4].

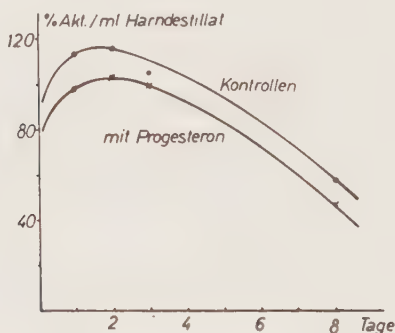


Abbildung 5

Einfluß von Progesteron auf die HTO-Bildung aus Glycerin-2-T.

HTO-Konzentration im Harndestillat in Prozent.

100% = Aktivität/ g Ratte.

Mittelwerte von je 6 Tieren.

III. Bestimmung der Oxidationsgeschwindigkeit des Oestradiols zu Oestron durch Radioaktivitätsmessung im Ausatemungswasser.

1. Aufbau einer Apparatur zum Auffangen des Ausatemungswassers von Versuchstieren

Ein entscheidender Nachteil der Aktivitätsmessungen im Harn war, daß sie ein Verfolgen des zeitlichen Ablaufs der Reaktion nur schlecht erlauben, da sich der zeitliche Abstand zwischen den Messungen wegen der geringen Harnmenge der Tiere nicht verkürzen ließ. Bereits bei der ersten Messung, die etwa 5-7 Stunden nach der Injektion erfolgen konnte, lagen mehr als 60% der eingesetzten Aktivität als Wasser vor. Die Differenz zwischen der Aktivität im Gesamtharn und im Harndestillat war schon in der Harnportion der ersten fünf Stunden sehr gering [vgl. Tab. 2, S. 10], d.h. es wurde kaum 17 β -Oestradiol-17 α -T ausgeschieden, sondern nur HTO. Im Verhältnis zur Oxidationsgeschwindigkeit war die Methode also zu langsam. Außerdem ist das Destillieren des Harns umständlich und mühsam.

Es mußte also ein Weg gefunden werden, um mit einer einfachen Methode in schneller Folge Proben von Körperwasser der Ratte zu gewinnen.

Auch mit forcierter Harnentleerung durch Druck auf die Harnblase oder mit Katheterisieren läßt sich nur alle 4-5 Stunden eine Harnprobe gewinnen, die zur Messung und Destillation ausreicht.

Funktion der Schwanzvene oder des retrobulbären Venenplexus und Verwendung von Blutplasma für die Aktivitätsmessung war aus folgenden Gründen nicht günstig:

1. Die häufige Punktion ist aufwendig.
2. Häufige Entnahme des für Messung und Destillation notwendigen Volumens bringt die Gefahr einer Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes der Ratte durch Blutverlust mit sich.
3. Es wäre wiederum eine Destillation notwendig.

Als Ausweg bot sich die Verwendung von Ausatemungswasser an. Die ausgeatmete Luft ist mit Wasserdampf gesättigt, der bei Einatmen trockener Luft aus den Schleimhäuten des Respirationstraktes und aus der Lunge stammt, also Körperwasser ist. Das Tier mußte trockene Luft einatmen, aus der Ausatemungsluft mußte der Wasserdampf kondensiert und das Wasser zur Aktivitätsmessung eingesetzt werden.

Bei Verwendung von kondensiertem Wasserdampf für die Tritium-Konzentrationsbestimmung muß mit dem Auftreten von Isotopie-Effekten gerechnet werden. Moore [26] verglich die HTO-Konzentration in Plasma, Urin und Ausatemungswasser eines Menschen nach intravenöser Injektion von HTO und fand im Ausatemungswasser 6% Radioaktivität weniger als in Plasma und Urin. Diese Abweichung darf, zumal bei vergleichenden Messungen, wohl in Kauf genommen werden, jedoch muß man sich darüber im Klaren sein, daß die Ergebnisse nur ein Mindestmaß für die Oxidationsgeschwindigkeit darstellen [vgl. S. 39].

Zur Gewinnung des Ausatemungswassers wurde die Ratte in eine Röhre gesetzt, durch die Luft strömte, die vorher getrocknet worden war. Abbildung 6 und 7 zeigen

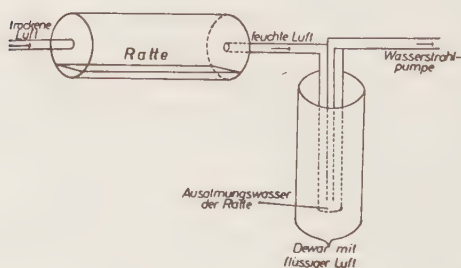


Abbildung 6

Schema der Apparatur zur Gewinnung des Ausatemungswassers von Ratten.

das Prinzip der Apparatur. Nach Passage durch die Röhre wurde die nunmehr feuchte Luft durch eine in flüssigen Stickstoff tauchende Vorlage geleitet, in der der Wasserdampf sich kondensierte und ausfror. Durch Wechseln der Vorlagen konnte alle halbe Stunde etwa 0,1 ml Atemwasser für eine Messung gewonnen werden.

Prüfung wurden, besonders bei jungen Ratten, zwei Tiere gleichzeitig in die Röhre gesetzt und das Atemwassergemisch aufgefangen, wodurch Mittelwerte für die Oxidation erhalten wurden. Da es sich um eine Konzentrationsmessung handelt, spielt es keine Rolle, wenn ein Tier das vom anderen ausgeatmete Wasser einatmet, nur die Ausbeute an Wasser wird dadurch beeinflusst. Allerdings wird keine exakte Mittelwertbildung erreicht, denn die Menge des abgegebenen Wasserdampfes ist nicht unbedingt für beide Ratten gleich. Die aufgefangene Menge kann für jede Ratte von ihrer jeweiligen Lage im Käfig abhängen. Dennoch konnte durch diese Maßnahme die Meßgenauigkeit erheblich erhöht werden: biologische Differenzen, die bei Tierversuchen immer eine Rolle spielen, wurden ebenso ausgeglichen wie Injektionsfehler.

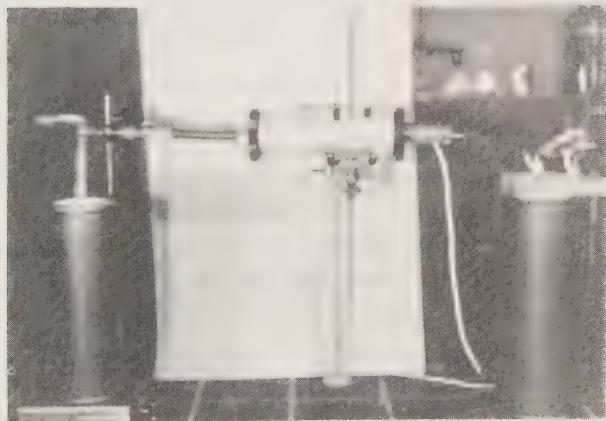


Abbildung 7

Apparatur zum Auffangen des Ausatemungswassers

Stellt man nun die Tritium-Konzentration im Ausatemungswasser in Abhängigkeit von der Zeit dar, so ergibt sich eine Kurve, in der sich zwei Komponenten überlagern:

1. Der Anstieg der Tritium-Konzentration durch HTO-Bildung aus Oestradiol-17 α -T.
2. Der Abfall der Tritium-Konzentration durch Verteilung des lokal gebildeten HTO im Organismus.

Bei Unterbrechung der Messung kommt als weiterer Konzentrationsvermindernder Faktor die Verdünnung durch zugeführtes Trinkwasser hinzu. Thompson [27] fand bei einer Bestimmung der Zeit, nach der die Hälfte des Körperwassers gegen neu aufgenommenes Wasser ausgetauscht ist, für Ratten 3,3 Tage. Ähnliche Werte wurden auch mit der hier beschriebenen Methode ermittelt. [28].

Anfangs wurden die Tiere zwischen den einzelnen Messungen aus der Apparatur herausgenommen und ihnen Gelegenheit zum Trinken gegeben, um möglichst physiologische Bedingungen einzuhalten und ein Austrocknen zu vermeiden. Die Meßwerte schwankten sehr stark, ohne daß dafür zunächst ein Grund gefunden werden konnte.

Es fiel auf, daß die gewonnene Wassermenge stark abnahm, wenn man das Tier längere Zeit ohne Unterbrechung im trockenen Luftstrom ließ; nach etwa zwei Stunden stellte sie sich jedoch auf einen konstanten Wert ein und erhöhte sich nur wieder, wenn die Ratte im Käfig urinierte. Es wurde ein physiologischer Anpassungsmechanismus an das Atmen trockener Luft vermutet, der die Tiere vor zu starker Austrocknung schützen würde. Jedoch blieb erstaunlich, daß am nächsten Tag der Effekt völlig abgeklungen war, in den ersten Stunden also wieder viel Wasser aufgefangen werden konnte. Beim Aufzeichnen der Kurven zeigte sich außerdem, daß die HTO-Konzentration im Wasser stark anstieg, auch wenn im Tier eine gleichmäßige Verteilung längst angenommen werden mußte, also Tage nach der Injektion des radioaktiven Materials. Ließ man die Tiere einige

Zeit in normal-feuchter Raumluft und mit Zugang zu Trinkwasser und setzte die Messung dann fort, so lagen die ersten Meßwerte erheblich zu tief, dann stieg die HTO-Konzentration im Laufe von etwa zwei Stunden stark an, um schließlich ein Plateau zu erreichen [Abb. 8].

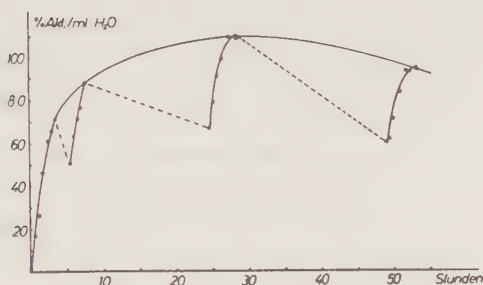


Abbildung 8

Verdünnung des Atemwassers durch Fellfeuchtigkeit

Im Beginn einer Meßreihe liegt die HTO-Konzentration des aufgefangenen Wassers zu niedrig. Es wird eine Verdünnung des Atemwassers durch Fellfeuchtigkeit angenommen.

Da auch die Wassermenge in diesen ersten Stunden immer zu groß war, wird angenommen, daß sich im Fell der Ratte viel Feuchtigkeit hält, die erst allmählich an die trockene Luft abgegeben wird. Fünfzehn Minuten Föhnen [29] bewirkte eine deutliche Verminderung des Effektes, beseitigte ihn jedoch nicht ganz.

Um die Verdünnung des ausgeatmeten Wassers durch Fellfeuchtigkeit zu vermeiden, wurden die Tiere in späteren Versuchen stets mehrere Stunden nacheinander in der Apparatur gelassen. Dabei wurde in Kauf genommen, daß sie sechs bis acht Stunden lang keine Flüssigkeit aufnehmen konnten. Da Ratten tags meist schlafen und vorwiegend nachts fressen und trinken, ist diese Maß-

nahme wahrscheinlich vertretbar, was physiologische Versuchsbedingungen angeht. Es wurde auch nie beobachtet, daß die Tiere sich sofort gierig auf Trinkwasser gestürzt hätten, wenn sie es angeboten bekamen, was Ratten, die beispielsweise über Nacht gedurstet haben, sofort tun.

Bei dieser Anordnung kann ein Maximum mit darauffolgendem Abfall der HTO-Konzentration nicht erwartet werden, da das Körperwasser nicht durch Trinkwasser verdünnt wird. Da jedoch der Anstieg sich über viele Stunden hinzieht und allmählich abflacht, ist ein scharfes Maximum sowieso nicht zu erwarten. Der Anstieg gibt ein Maß für die Geschwindigkeit der Oxidation, die Höhe des Maximums zeigt den prozentualen Umsatz an, während der Abfall stark von der Ausscheidung und von der Wasseraufnahme beeinflußt wird und bei kleineren Tieren [Jungtieren] steiler ist als bei großen.

2. Oxidationsgeschwindigkeit von Oestradiol-17 β bei weiblichen Ratten

Abbildung 9 zeigt, daß mit dieser Methode der Anstieg der HTO-Konzentration im Körperwasser gut verfolgt werden kann. Die Werte für weibliche Ratten stimmen mit denen der Harnversuche überein [vgl. Tab. 4, S. 15], jedoch erlauben sie eine viel genauere Aussage. Die HTO-Konzentration steigt, nur allmählich langsamer werdend, an und hat nach acht Stunden noch kein Maximum erreicht.

Für männliche Ratten fand Kraas [29] einen praktisch gleichen Anstieg der HTO-Konzentration nach Injektion von Oestradiol-17 α -T. Die in den Harnversuchen festgestellten Geschlechtsunterschiede [vgl. S. 11] scheinen also überwiegend durch das unterschiedliche Gewicht der Tiere und unterschiedliche Harnmengen zustande gekommen zu sein.

3. Einfluß einer Progesteron-Vorbehandlung

Der Einfluß einer Vorbehandlung mit Progesteron sollte überprüft werden, da die Versuche mit Radioaktivitätsbestimmung im Harn nicht zu klaren Resultaten geführt hatten [vgl. S. 13-15].

Weibliche Ratten bekamen 3mal jeden zweiten Tag 1 mg Progesteron als Vorbehandlung. Bei der folgenden Injektion von Oestradiol- 17α -T und Verfolgung des HTO-Konzentrationsanstiegs im Atemwasser zeigte sich kein Unterschied zu unbehandelten Ratten, wie aus Abbildung 9 ersichtlich ist. Auch eine Erhöhung der Progesteron-Dosis auf 3mal 5 mg hatte keine Wirkung.

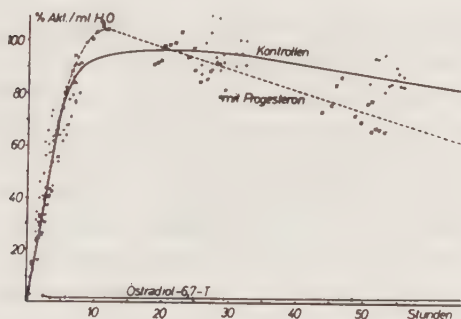


Abbildung 9

HTO-Konzentration im Ausatemungswasser weiblicher Ratten nach Injektion von markiertem Oestradiol.

Obere Kurven: Progesteron-behandelte und unbehandelte Ratten mit Oestradiol- 17α -T.

Untere Kurve: Injektion von Oestradiol- $6,7$ -T bei einer weiblichen Ratte [31].

Angaben in % Aktivität. 100% = inj. Akt./Gramm Ratte.

Die biologische Hemmung Östrogen-induzierter Veränderungen an den Genitalorganen hängt stark vom Verhältnis

Oestradiol : Progesteron ab. Am Vaginalepithel der Maus soll ein Verhältnis von 1 : 75 bereits zur Neutralisierung der Progesteron-bewirkten Hemmung führen [30]. Eine Erhöhung der Progesteron-Dosis auf mehr als das 75fache der applizierten Oestradiolmenge erschien jedoch nicht sinnvoll, da die Mengen beider Hormone sowieso weit über den physiologisch bei Ratten vorkommenden Mengen lagen. Nach Kaiser [30] führt zudem Überdosierung des Oestradiols zur Verhinderung der anti-östrogenen Wirkung des Progesterons, in welchen Mengen dieses auch zugeführt wird.

4. Wirkung von Progesteron auf die Ausscheidung von Oestradiol und seinen Metaboliten im Harn

Da die auf Seite 13 beschriebenen Versuche zunächst eine Hemmung der HTO-Bildung aus Oestradiol-17 α -T durch Vorbehandlung mit Progesteron zu zeigen schienen, wurde ergänzend auch die Wirkung der Progesteron-Vorbehandlung auf die Oestrogen-Ausscheidung im Harn bestimmt. Vorbehandelte und unbehandelte weibliche Ratten erhielten 17 β -Oestradiol-6,7-T, also eine Verbindung, die ihr Tritium-Atom beim Stoffwechselgeschehen nicht verliert [vgl. Formelschema 2, S.3]. Im Ausatmungswasser

Tabelle 6

Einfluß von Progesteron auf die Ausscheidung von Oestradiol und -metaboliten im Harn

Injektion von 30 μ Ci Oestradiol-6,7-T pro Ratte.
Ausscheidung von Tritium im Harn 0-6 Stunden nach Injektion in % der applizierten Aktivität.
100% = inj. Akt. pro Gramm Ratte.
Mittelwerte von je vier Tieren.

	Harnmenge ml	Akt. im Gesamtharn %	Akt. pro ml Harn %
mit Progesteron- Vorbehandlung	5,8	4,03	0,66
ohne Vorbehandlung	7,0	7,59	1,08

tritt nach Applikation des so markierten Hormons praktisch keine Radioaktivität auf, wie in Abbildung 9 dargestellt ist [nach 31].

Der Tritiumgehalt des Harns entspricht in diesem Versuch der Ausscheidung von Oestradiol und daraus entstandenen Metaboliten, da Tritium bei dieser Markierung im Steroidgerüst verbleibt. Tabelle 6 zeigt, daß Progesteron keinen wesentlichen Einfluß auf die Oestrogenausscheidung im Harn hat, eher aber zu einer Verminderung führt. Die biologische Hemmung der Oestrogenwirkung durch Progesteron kommt also nicht durch eine beschleunigte Ausscheidung von Oestradiol zustande.

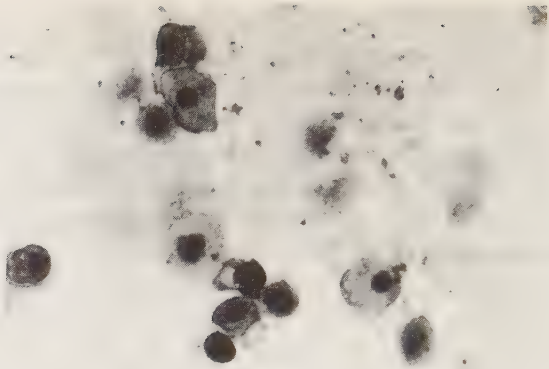
5. Einflüsse des Zyklus

Die endogen gebildete Menge von Oestradiol unterliegt im Verlaufe des Zyklus einem ständigen Wechsel. Ebenso ändern sich Menge und Verhältnis von ausgeschiedenem Oestradiol und Oestron im Harn ständig. Es wäre also eine wechselnde Oxidationsgeschwindigkeit des Oestradiols zu Oestron in Abhängigkeit von der Zyklusphase denkbar. Allerdings fanden Stimmel und Stealy [32] beim Menschen nach Injektion von Oestron keine Abhängigkeit der Ausscheidungsquote für Oestradiol, Oestron

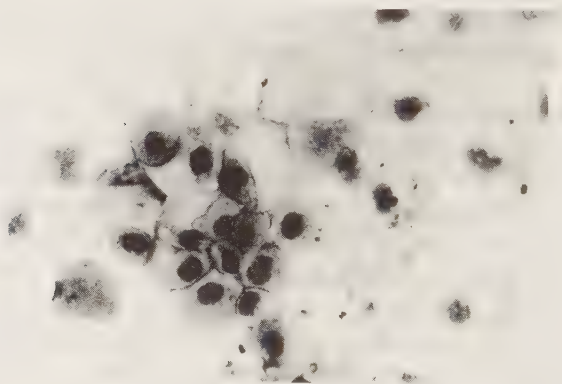
Tabelle 7

Bestimmung der Zyklusphase an Hand von Vaginal-
abstrichen [nach 33]

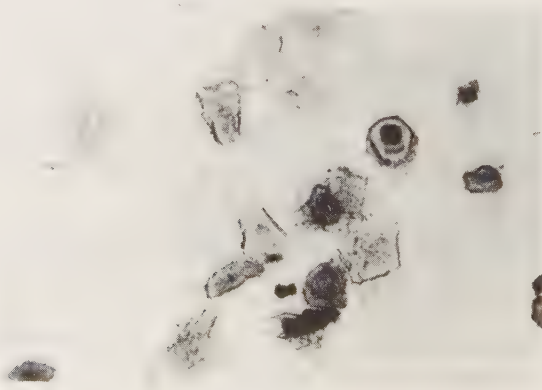
Dauer [Tage]	Phase	Befund im Vaginalabstrich
1/2 - 1	Proöstrus	Viele runde Epithelzellen
1 - 2	Oestrus	Große polygonale Epithelzellen mit pyknotischen Kernen, unregelmäßig begrenzte kernlose Hornplättchen, Schleim.
1	Metöstrus	Verhornte und zerfallende Epithelzellen, viele Leukozyten.
1 - 2	Diöstrus	Wenig Epithelzellen, wenig Leukozyten.



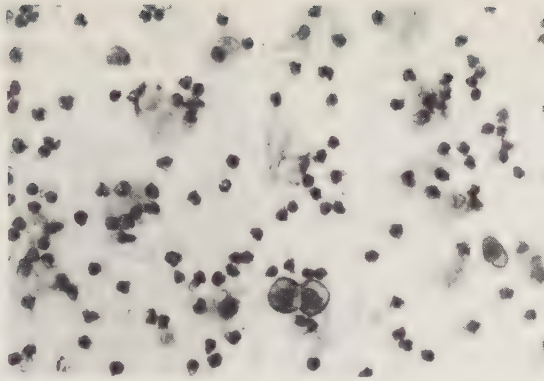
a] Proöstrus: intakte Epithelzellen



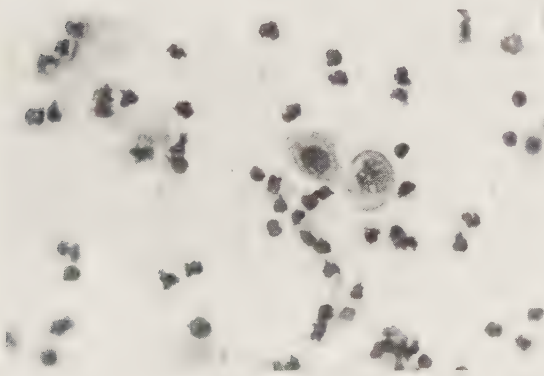
b] Proöstrus: beginnende Verhornung der Epithelzellen



c] Östrus: Verhornte Epithelzellen



d] Metöstrus: Leukozyten, einzelne Epithelzellen



e] Metöstrus [gleiches Präparat wie d] in stärkerer Vergrößerung].

Abbildung 10

Vaginalabstrichpräparate aus verschiedenen Zyklusphasen

Objektiv: Apo 25/0,75 [Abb. 10e Apo 40/1,0 Oel]

Okular: Foto-Okular 6,3x

Vergrößerung: Abb. 10a-d 60fach

Abb. 10e 100fach

und Oestriol von der Zyklusphase. Bei dieser Bestimmung wird aber nur die Lage des Gleichgewichtes, nicht die Geschwindigkeit der Oxidation erfaßt.

Bei Ratten läßt sich die Zyklusphase an Hand von Vaginalabstrichen gut feststellen. Unter Oestrogeneinfluß verhornen die Vaginalepithelien, dann zerfallen die Hornplättchen, Leukozyten treten in großer Menge auf, und schließlich findet man nach einer kurzen Diöstrusphase - Ratten haben keine ausgeprägte Lutealphase - neue kernhaltige Epithelzellen im Ausstrich, bis wieder die Verhornung einsetzt. Die Dauer der verschiedenen Phasen und die zugehörigen Befunde im Vaginalabstrich sind in Tabelle 7 [nach 33] zusammengestellt. Abbildung 10 zeigt Präparate des Vaginalabstriches in verschiedenen Phasen.

Um die Abhängigkeit der Oxidationsgeschwindigkeit des Oestradiols von der Zyklusphase nachzuprüfen, wurden mehrere Tage nacheinander Vaginalabstriche angefertigt und jeweils zwei in der gleichen Zyklusphase befindliche Rattenweibchen ausgesucht und für einen Versuch verwendet. Es wurden zwei Weibchen in Proöstrusphase und zwei im Stadium des Diöstrus untersucht, also bei maximaler und minimaler endogener Oestrogenproduktion. Jedoch konnten, wie in Abbildung 11 dargestellt ist,

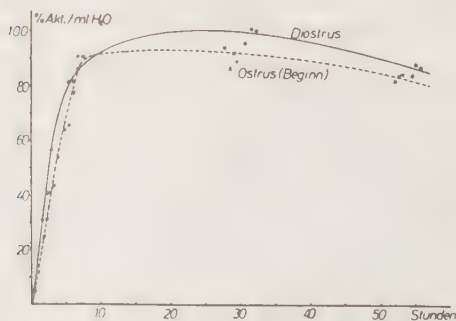


Abbildung 11

Oestradiol-Oxidation in verschiedenen Zyklusphasen

keine Unterschiede in der Oxidationsgeschwindigkeit gefunden werden. Es scheint also keine Beeinflussung der Enzymaktivität im Verlauf des Zyklus stattzufinden. Die bei Frauen in verschiedenen Zyklusphasen unterschiedliche Ausscheidung endogen gebildeter Oestrogene im Harn [11] beruht wahrscheinlich auf den wechselnden Sekretionsraten für Oestradiol und Oestron und nicht auf unterschiedlicher Abbaugeschwindigkeit. Dafür spricht auch der oben erwähnte Befund von Stimmel und Stealy [32], daß exogen zugeführtes Oestron unabhängig von der Zyklusphase zu immer gleichem Verhältnis der im Harn ausgeschiedenen Oestrogene führt.

6. Oxidationsgeschwindigkeit des Oestradiols bei Jungtieren und Überprüfung des Primobolan-Einflusses

Bei den Messungen im Harn stieg nach Vorbehandlung mit Primobolan bei Jungtieren die HTO-Ausscheidung nach Applikation von Oestradiol-17 α -T an [vgl. S.12]. Dieser Anstieg darf allerdings nicht von vornherein auf eine beschleunigte Oestradiol-Oxidation bezogen werden, sondern kann auch durch Vermehrung der ausgeschiedenen Harnmenge zustandegekommen sein, da die Gesamtausscheidung von HTO pro 24 Stunden bestimmt wurde.

Um diese Frage auch mit der verbesserten Methodik zu prüfen, wurden noch einmal männliche Jungtiere mit Primobolan vorbehandelt und bekamen dann, ebenso wie unbehandelte männliche und weibliche infantile Jungtiere, Oestradiol-17 α -T injiziert. Bei der Bestimmung der HTO-Konzentration im Ausatmungswasser ergab sich kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Jungtieren; auch die Primobolan-Vorbehandlung zeigte keine Wirkung.

Jedoch war, wie aus Abbildung 12 hervorgeht, bei den Jungtieren insgesamt der Anstieg der HTO-Konzentration steiler als bei den erwachsenen Weibchen. Daß die Radioaktivität im Körperwasser der Jungtiere nach Errei-

chen des Maximums auch schneller abnimmt als bei erwachsenen Tieren, hat seinen Grund in der kürzeren Halbwertszeit für Körperwasser bei kleineren Tieren. Ob jedoch auch der steilere Anstieg auf das geringere Körpervolumen zu beziehen ist, erscheint fraglich. Zwar differiert bei Jungtieren der Anteil der verschiedenen

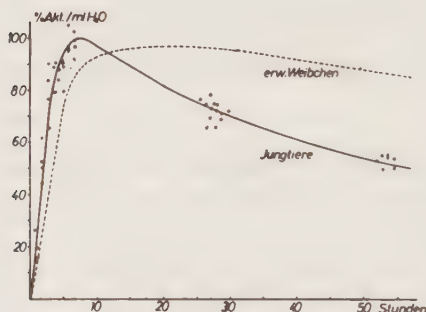


Abbildung 12

Oxidation von Oestradiol-17 α -T bei jungen männlichen und weiblichen Ratten mit und ohne Primobolan-Vorbehandlung.

Injektion von 25 μ Ci Oestradiol-17 α -T pro Tier. Konzentration von HTO im Ausatemungswasser in %. 100% = inj. Akt./g Ratte. 4 unbehandelte männliche, 2 unbehandelte weibliche und 2 vorbehandelte männliche infantile Ratten. Zum Vergleich ist die Kurve für erwachsene Weibchen eingezeichnet.

Gewebe am Körpergewicht von der Verteilung bei erwachsenen Tieren; so ist z.B. die stoffwechselaktive Leber relativ viel größer, während das Fettgewebe, das durch Speicherung von Steroiden eine Depotwirkung hervorrufen könnte, bei Jungtieren einen viel geringeren Anteil am Körpergewicht ausmacht. Ob es aber wirklich diese Faktoren sind, die zu einem schnelleren HTO-Konzentrationsanstieg führen, oder ob tatsächlich eine schnellere Oestradiol-Oxidation stattfindet, muß noch geklärt werden. Da der Oestrogenstoffwechsel des Feten stark von

dem des erwachsenen Organismus abweicht und im Verlauf des Heranwachsens des Tieres in diesen übergeht, wäre auch eine Abweichung der Enzymaktivität oder eine Verschiebung des Gleichgewichtes denkbar. Beim Menschen tritt allerdings der Übergang vom fetalen zum erwachsenen Oestrogenstoffwechsel schon in den ersten drei Lebensjahren ein; schon beim drei- bis neunjährigen Kind führt eine Oestrogenbelastung zu im wesentlichen gleichen Abbau- und Ausscheidungsvorgängen wie beim Erwachsenen [11], während die endogene Oestrogensekretion bis zur Pubertät niedrig bleibt.

7. Vorbehandlung mit Thyroxin

Nachdem Primobolan als synthetisches Anabolikum keinen Einfluß auf die Oestradiol-Oxidation gezeigt hatte, sollte auch die Wirkung eines oxidationsfördernden Hormons, nämlich Thyroxin, untersucht werden. Thyroxin zeigt unter physiologischen und pathologischen Bedingungen vielfache wechselseitige Beziehungen zu den Oestrogenen. Beim Menschen kommt es bei Thyreotoxikosen zu Amenorrhoe. Auch bei fehlender Schilddrüsenfunktion ist die Fertilität gestört, es kommt zu dysfunktionalen Blutungen und zur Gonadenatrophie.

Gallagher beschreibt beim Menschen einen Einfluß von Thyroxin auf die Ausscheidung von Oestron, Oestriol und Methoxyöstron im Harn nach Injektion von Oestradiol [34].

In der hier durchgeführten Messung zeigten Thyroxin-vorbehandelte weibliche Ratten keinen Unterschied der Oxidationsgeschwindigkeit von Oestradiol zu Oestron gegenüber unbehandelten Kontrollen [Abb. 13].

Für eine Diskussion dieses Ergebnisses s. S. 41.

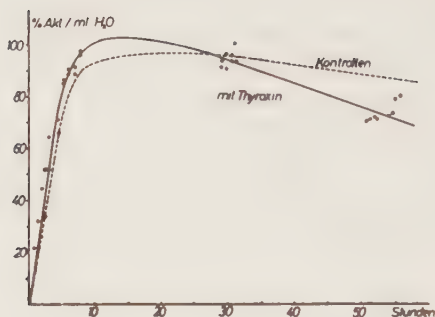


Abbildung 13

Einfluß von Thyroxin auf die HTO-Bildung aus Oestradiol- 17α -T

Vier weibliche Ratten erhielten je 25 μ Ci Oestradiol- 17α -T, nachdem sie mit je 0,1mg Thyroxin vorbehandelt waren. HTO-Konzentration im Ausatmungswasser in %. 100% = Akt./Gramm Ratte. Zum Vergleich ist die Kurve für unbehandelte Weibchen eingezeichnet.

8. Versuche über die Oxidationsgeschwindigkeit des Oestradiols bei Mäusen mit Mamma-Tumoren

Oestrogene haben eine mitosesteigernde und damit proliferationsfördernde Wirkung, besonders auf die Genitalorgane und auf die Brustdrüse. Da sie außerdem strukturell den carcinogen wirkenden aromatischen Kohlenwasserstoffen Anthracen und Phenantren ähnlich sind, hat man immer wieder eine carcinomauslösende Wirkung postuliert. Jedoch konnten zwar Epithelmetaplasien, nie jedoch eine Carcinomentstehung beim Menschen wirklich nachgewiesen werden [11]. Allerdings scheint das Wachstum bestimmter Mamma-Carcinome durch Oestrogene gefördert zu werden. Dabei besteht keine Beziehung zwischen dem histologischen Befund und der Oestrogenabhängigkeit.

Die Ausscheidung von Oestrogenen im Harn von Patienten mit Mammatumoren ist häufig untersucht worden, doch haben sich keine signifikanten Unterschiede zu Gesunden ergeben. Die Menge der Gesamtöstrogene und auch das Verhältnis von Oestron : Oestradiol : Oestriol ist bei Carcinom-Patienten und gesunden Probanden gleich, sowohl bei Männern wie auch bei Frauen [11].

In vitro fand Breuer [35], daß normales menschliches Mamma-Gewebe und Mammacarcinom-Gewebe mehr Oestradiol zu Oestron und anderen phenolischen und nicht-phenolischen Metaboliten umsetzen als andere Gewebe. Bei Ratten mit experimentell erzeugten Mammatumoren konnte er ebenfalls im Carcinomgewebe einen höheren Umsatz von Oestradiol zu Oestron und Oestriol finden als in anderen Geweben. Es bestand keine Abhängigkeit von Größe und Alter des Tumors [36].

Ryan und Engel [1] fanden, daß 17 β -Oestradiol durch normales und neoplastisches Mamma-Gewebe in gleichem Umfang zu Oestron und anderen Metaboliten umgewandelt wurde.

Die bisherigen Ergebnisse über den Oestrogenstoffwechsel der Mammatumoren sind also keineswegs einheitlich. Es scheint neben östrogenabhängigen Carcinomen auch völlig unabhängige zu geben.

Wenn sich jedoch eine veränderte Geschwindigkeit der Oestronbildung aus Oestradiol in östrogenabhängigen Tumoren nachweisen lassen sollte, so hätte man mit der hier beschriebenen Methode zur Bestimmung der Oestradiol-Oxidation ein Mittel zur Diagnostik solcher Tumoren in der Hand.

Bedeutungsvoll für die Therapie kann besonders die Differenzierung zwischen östrogenabhängigen und -unabhängigen Mammacarcinomen sein, da unabhängige durch Kastration und Nebennierenexstirpation nicht beeinflußt werden können, während durch diese Maßnahmen bei östrogenabhängigen Mammatumoren häufig Besserung oder doch Verlangsamung des Wachstums und der Metastasierung er-

reicht werden kann. Auch bei Radikaloperation von Mammacarcinomen in frühen Stadien könnte eine solche Differenzierung die Entscheidung über prophylaktische Kastration zur Vermeidung von Rezidiven erleichtern.

In Untersuchungen an Mäusen mit Mamma-Tumoren sollte festgestellt werden, ob tumortragende Tiere und gesunde Oestradiol unterschiedlich schnell oxidieren. Die Versuche boten erhebliche methodische Schwierigkeiten. Um genügend Ausatmungswasser zur Messung zu erhalten, mußten fünf Tiere gleichzeitig in die Apparatur gesetzt werden. Die Werte schwankten sehr erheblich.

Abbildung 14 zeigt das Ergebnis eines entsprechenden Versuchs, wonach tumortragende Mäuse Oestradiol etwas langsamer zu oxidieren scheinen als gesunde. Jedoch ist dieses Ergebnis noch nicht gesichert und die Untersuchungen werden zur Zeit fortgeführt.

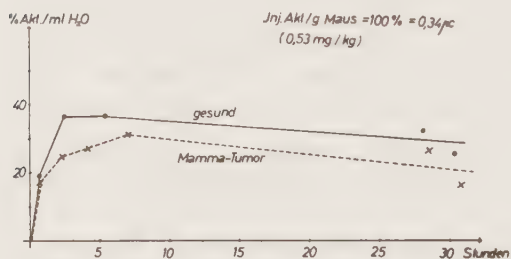


Abbildung 14

Oestradiol-Oxidation bei tumortragenden Mäusen.

Tabelle 8

Oestradiol- Oxidation bei Ratten

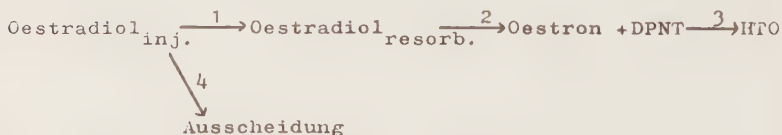
Tiere	inj.Menge µg/kg	Mindestoxidation bezogen auf Körpergewicht Körperwasser %	Std.bis zum Maximum	Abb.Seite
weibl.geschlechts- reife Ratten	20	95-105	65-75	nach 8 Std.noch kein Maximum
weibl.Ratten mit Progesteron	20	95-105	65-75	"
weibl.Ratten mit Thyroxin	20	95-105	65-75	"
infantile weibl.Ratten	30	95-105	65-75	6-7
infantile männl.Ratten	30	95-105	65-75	6-7
infantile Männchen mit Primobolan	25	95-105	65-75	6-7

IV. Diskussion

Die Untersuchungen zeigen, daß das angegebene Prinzip der stoffwechsel-"labilen" Markierung mit Tritium die Möglichkeit bietet, die Oxidation von 17 β -Hydroxysteroiden zu 17-Ketosteroiden in vivo zu bestimmen. Um die zeitliche Abhängigkeit der Oxidation verfolgen zu können, mußte ein Verfahren entwickelt werden, um die HTO-Konzentration im Körperwasser in kurzen Zeitabständen zu messen. Es zeigte sich, daß bei Ratten Messungen im Hardestillat diese Möglichkeit nicht boten. Bestimmungen im Ausatemungswasser sind einfacher und genauer.

Die Oxidation des Oestradiols zu Oestron ist reversibel und verläuft im Körper bis zu einem Gleichgewicht. Mit der hier beschriebenen Methode wird jedoch nur die primäre Oxidation gemessen; es sind keine Aussagen über das tatsächliche Verhältnis von Oestradiol und Oestron im Körper möglich.

Quantitative Aussagen über die Geschwindigkeit der Oxidation sind nur möglich, wenn sie der limitierende Faktor für das Auftreten von HTO im Körperwasser ist.



Betrachtet man an Hand des obigen Schemas den Weg des Tritiums im Körper vom Oestradiol-17 α -T zum HTO, so lassen sich folgende Einzelschritte abgrenzen, von denen gefordert werden muß, daß sie schnell verlaufen im Vergleich zur Oestradiol-Oxidation [Schritt 2]:

1. Die Resorption des injizierten Oestradiols [Schritt 1]:
Da Oestradiol stets in hydrophilen Lösungsmitteln injiziert wurde, kann man eine praktisch vollständige Resorption von der Injektionsstelle innerhalb weniger Minuten annehmen.
2. Ausscheidung des im Blut kreisenden Oestradiols über

die Niere [Schritt 4]:

Die direkte Ausscheidung von injiziertem Oestradiol in freier Form ist unwahrscheinlich, da es bereits wenige Minuten nach der Injektion vollständig aus dem Blut verschwunden ist [11].

3. Die Oxidation von DPN-T bzw. TPN-T über die Atmungskette zu HTO [Schritt 3]:

Wenn die Oxidation des DPN-T oder TPN-T über die Atmungskette der begrenzende Faktor für das Auftreten von HTO im Körperwasser wäre, so müßte eine Steigerung der DPNH-Oxidation, wie sie durch Thyroxin bewirkt wird [37], zu einem schnelleren Anstieg der HTO-Konzentration im Körperwasser führen. Wie gezeigt werden konnte, hat eine Vorbehandlung der Ratten mit Thyroxin jedoch keinen Einfluß auf diesen Anstieg [s. S. 33].

4. Die Verteilung des lokal gebildeten HTO:

Injiziertes HTO ist nach Bloch et al. [38] beim Menschen nach etwa 20 Minuten gleichmäßig im Organismus verteilt, in den gut durchbluteten Organen sogar erheblich schneller. Für kleinere Tiere wie Ratten dürfte diese Zeit eher noch kürzer sein.

Man kann also annehmen, daß die aufgeführten Faktoren den Anstieg der HTO-Konzentration im Körperwasser nicht begrenzen und daß dieser wirklich die Geschwindigkeit der Oxidation von Oestradiol-17 α -T zu Oestron anzeigt.

Eine Reihe von Faktoren, die die Meßwerte im Vergleich zur tatsächlichen Oxidation erniedrigen, müssen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden:

1. Tritium kann von den reduzierten Pyridinnucleotiden, insbesondere von TPN-T, bei reduktiven Prozessen auch in andere Substrate eingebaut werden und geht damit für die HTO-Bildung verloren.
2. Bei Verwendung von Ausatemungswasser für die HTO-Bestimmung tritt ein Isotopie-Effekt auf [vgl. S. 20].
3. Die Verteilung der markierten Substanzen, des inji-

zierten Steroids und des gebildeten HTO im Körper beanspruchen eine Zeitspanne, die zwar im Vergleich zur Oestradiol-Oxidation kurz ist, aber doch prinzipiell zu einer Verzögerung des Auftretens von HTO im Atemwasser führen kann.

Die Bestimmungen der HTO-Konzentration im Ausatemwasser ergeben daher immer nur ein Mindestmaß für die Oxidationsgeschwindigkeit.

Der Fortschritt der entwickelten Methode wird besonders deutlich beim Vergleich mit der bisherigen Arbeitsweise. Bei in-vivo-Untersuchungen über Steroidhormone wurden bisher vorwiegend Bilanzversuche gemacht: Eine bestimmte Menge des Hormons wurde injiziert und die Metabolite aus dem Harn oder nach Töten des Tieres aus den Organen extrahiert. Dabei sind nur Aussagen über den wiedergefundenen Anteil möglich, der meist einen geringen Prozentsatz ausmacht. Entsprechend war auch der Versuchsaufbau bei Fishman et al. [9], die Oestradiol-17 α -T verwendeten [vgl. S. 2].

Im Gegensatz dazu wird bei der hier angewendeten Methode eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt, die am lebenden Tier Rückschlüsse auf die im Gesamtorganismus befindliche Menge an oxidiertem Hormon zuläßt, da das Prinzip auf der Messung von HTO beruht, dessen Verteilung im Körperwasser gleichmäßig ist.

Häufig wurden für den oxidierten Anteil des applizierten Hormons Werte über 100% in den entsprechenden Kurven angegeben, was sich aus dem verwendeten Bezugssystem erklärt. Als 100% wurden jeweils die pro Gramm Ratte injizierten Radioaktivitätsmengen festgesetzt. Bei dieser Art der Auswertung wird das Körpergewicht der Tiere berücksichtigt, doch kommt als Verteilungsraum für das gebildete HTO nur das Körperwasser in Frage, das $70 \pm 10\%$ des Gewichtes ausmacht.

Der Wassergehalt des Körpers nimmt mit zunehmendem Alter ab und wird auch vom Fettanteil beeinflusst. So fanden Udekwu et al. [39] bei 20jährigen Männern als

Verteilungsraum für injiziertes HTO 70% des Körpergewichtes, bei 60jährigen Frauen dagegen nur 50%. Für ein Bezugssystem, in dem als 100% die injizierte Aktivitätsmenge pro ml Körperwasser gesetzt würde, wäre also eine Bestimmung des Wassergehaltes bei jedem Tier notwendig, was einen erheblichen Aufwand erfordern würde. Daher wurde auf diese Berechnung verzichtet und in Kauf genommen, daß die Prozentangaben nur relative Werte darstellen, zumal das für vergleichende Messungen [Einflüsse von Hormonen usw.] ausreicht. In Tabelle 8 ist jedoch unter Zugrundelegung eines Wassergehaltes von 70% des Gewichtes auf absolute Werte des Umsatzes umgerechnet worden [S. 37].

Der Prozentsatz an "wiedergefundenem" - d.h. durch Konzentrationsmessung und Rückschluß auf die im Wasser des Gesamttieres vorhandene HTO-Menge erfaßtem - Tritium lag nach acht Stunden bei 70% der eingesetzten Aktivitätsmenge. Zu dieser Zeit war ein Maximum noch nicht ganz erreicht. Dieses Ergebnis sowie die Tatsache, daß kaum an Festsubstanz gebundenes Tritium im Harn ausgeschieden wurde, zeigen, daß der wesentliche Teil des Tritiums zu HTO oxidiert und nicht für die Reduktion von Substraten verwendet wird. Das spricht dafür, daß die 17 β -Oestradiol-Dehydrogenase vorwiegend mit DPN als Coferment arbeitet und weniger mit TPN, da der Wasserstoff aus DPNH vorwiegend zu Wasser oxidiert wird, während er aus TPNH für reduktive Synthesen verwendet wird [40].

Keine der untersuchten Substanzen, Progesteron, Primobolan, Thyroxin, bewirkte eine Änderung der Oxidationsgeschwindigkeit des Oestradiols. Gegen eine methodische Ursache hierfür sprechen die Untersuchungen von Kraas [29], der bei lebergeschädigten Tieren eine verzögerte HTO-Bildung aus Oestradiol-17 α -T fand, und von Christ [28], der die Testosteron-Oxidation in vivo mit der gleichen Methode untersuchte und die doppelte Oxidations-

geschwindigkeit für den Umsatz des Testosterons zu Androstendion feststellte.

Eine Hemmung der durch Oestradiol stimulierten DPNH-Oxidation durch Progesteron wurde, wie auf Seite 13 ausgeführt, von verschiedenen Autoren in vitro gefunden, ließ sich jedoch nicht in vivo nachweisen. Die biologisch antiöstrogene Wirkung des Progesterons ist nach Kaiser [30] beim Menschen stark abhängig von der Dosierung: schon bei einem Östrogen : Progesteron - Verhältnis von 1 : 75 ist die Progesteron-Hemmung aufgehoben. Bei Überdosierung von Oestradiol bewirken auch sehr hohe Dosen von Progesteron keine Hemmung der Oestradiolwirkung mehr.

In unseren Versuchen lag die Oestradiol-Dosis mit 40 - 45 µg pro Ratte um das 40fache höher als die im Vaginalverhornungstest nach Allen und Doisy bei Ratten wirksame Mindestmenge. Die injizierte Hormondosis hätte sich noch reduzieren lassen, was jedoch wegen des besseren Radioaktivitätsnachweises bei der Verwendung größerer Mengen nicht geschah. Bei Applikation einer Menge von weniger als 1 µg [im Allen-Doisy-Test bei Ratten wirksame Menge] hätte die Radioaktivitätsmenge nicht für einen sicheren Nachweis ausgereicht.

Es muß damit gerechnet werden, daß eine Applikation so unphysiologisch hoher Mengen des Hormons zu Änderungen im Stoffwechsel führen kann. Mindestens aber kann die Empfindlichkeit gegen Hemmung durch Antiöstrogene herabgesetzt sein.

Daß auch die in verschiedenen Zyklusphasen wechselnden Mengen endogen produzierten Oestradiols keinen Einfluß auf die Oxidationsgeschwindigkeit hat, erscheint einleuchtend, da körpereigenes Oestradiol mengenmäßig gar keine Rolle spielt im Vergleich zur zugeführten Dosis. Die Untersuchungen zeigen jedoch, daß sich keine zyklische Änderung der Oestradiol-Dehydrogenase-Aktivität nachweisen läßt.

Obwohl eine Hemmung der Oestradiol-Oxidation durch Progesteron nicht nachweisbar war, sollte sicherheitshalber

mit einem anderen intrazellulär DPN-T-liefernden Substrat eine eventuelle Hemmung der DPNH-Oxidation durch Progesteron geprüft werden. Beim Messen der HTO-Bildung aus Glycerin-2-T [Schema der Reaktion S. 16] konnte keine Verlangsamung der Oxidation gefunden werden.

Allerdings kann aus Glycerin-2-T auch ohne Beteiligung der Atmungskette HTO entstehen, wenn Tritium durch die Glycerophosphat-Oxidase in den Mitochondrien [Meyerhof-Green-Enzym] auf FAD übertragen wird. Von dem gebildeten FAD-T gelangt Tritium durch Austausch mit H^+ ins Wasser, ohne daß eine Oxidation des primär gebildeten FAD-T über die Atmungskette ablaufen muß.

Die Untersuchungen über den Einfluß des Progesterons auf die Ausscheidung des Steroidgerüsts von Oestradiol im Harn [S.26] zeigen ferner, daß unter Progesteron-Wirkung nicht eine verstärkte Ausscheidung von Oestradiol-Metaboliten zu einer Verminderung der biologischen Oestrogenwirkung führt.

Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Progesteron nicht den Oestrogenhaushalt und -stoffwechsel beeinflusst. Man wird vielleicht eher an bestimmten Zielorganen eine Beeinflussung der Rezeptorempfindlichkeit vermuten können. Das paßt auch zu der Tatsache, daß Progesteron einige Oestradiol-Wirkungen verstärkt, andere jedoch hemmt, was bei einer inaktivierenden Wirkung auf die Oestrogene selbst nicht zu erklären wäre.

Eine eventuelle Bedeutung der beschriebenen Untersuchungsmethode für die klinische Diagnostik solcher Krankheiten, die mit einem veränderten Oestrogen-Stoffwechsel einhergehen können, wurde bereits bei den Versuchen mit tumortragenden Mäusen auf Seite 34 angeschnitten. Erste klinische Anwendungen dieser Methode wurden bei lebergeschädigten Patienten im Vergleich zu solchen mit normaler Leberfunktion zur Untersuchung einer eventuellen Abweichung des Oestradiolabbaus bei Lebererkrankungen durchgeführt [41].

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Albinoratten eigener Zucht verwendet. Das Gewicht lag zwischen 150 und 220 Gramm für Weibchen, zwischen 250 und 300 Gramm für Männchen. Die Jungtiere waren etwa 4 Wochen alt und wogen 50 - 80 Gramm.

Für die Versuche über Mamma-Carcinome wurden männliche Mäuse des Stammes C3H verwendet, denen der Tumor [Stamm Schering 1] unter die Nackenhaut implantiert worden war.

2. Injektionslösungen

Die Tritium-markierten Oestradiol-Präparate wurden freundlicherweise von der Schering A.G. Berlin [Herr Dr. P.E. Schulze] zur Verfügung gestellt.

17 β -Oestradiol-17 α -T hatte eine spezifische Aktivität von 642 μ Ci/mg. Die Reinheit des Präparates wurde durch Dünnschichtchromatographie auf einer analytischen Platte mit Kieselgel H überprüft. Als Laufmittel diente Essigester - Cyclohexan 40:60; zum Vergleich wurde nicht-markiertes Oestradiol aufgetragen.

Die Radioaktivitätsmessung erfolgte im "Dünnschicht-Scanner" der Firma Berthold und ergab ein Maximum mit $R_F = 0,36$ [s. Abb. 15]. Beim Anfärben mit Schwefelsäure-Methanol entstand ein rotgelber Fleck, der mit dem der Vergleichssubstanz übereinstimmte. Damit war die Reinheit des Präparates nachgewiesen.

Zur Injektion wurde das Oestradiol zunächst in Äthanol-physiologische Kochsalzlösung 1:3 gelöst verwendet. Wegen der schlechten Wasserlöslichkeit von Oestradiol war die Lösung jedoch sehr wenig stabil. Außerdem waren Nebenwirkungen des Alkohols auf die Tiere nicht auszuschließen. Daher wurde auf Propylenglycol-physio-

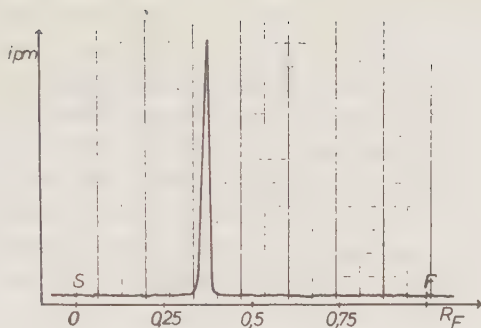


Abbildung 15

Radiochromatogramm zum Nachweis der Reinheit des
Oestradiol-17 α -T

logische Kochsalzlösung 1:1 übergegangen. Dieses Lösungsmittel war gut geeignet:

1. Oestradiol ist gut löslich und fiel niemals aus der Lösung aus.
2. Propylenglycol ist mit Wasser unbegrenzt mischbar, was eine schnelle Resorption von der Injektionsstelle gewährleistet.
3. In dieser Verdünnung ist Propylenglycol gut verträglich.
4. In dem verwendeten Mischungsverhältnis ist die Viskosität des Propylenglycols soweit herabgesetzt, daß die Injektion keine wesentlichen Schwierigkeiten machte und die Dosierung recht genau möglich war.

17 β -Oestradiol-6,7-T hatte eine spezifische Aktivität von 1,55 mCi/mg. Es wurde in Äthanol-physiologischer Kochsalzlösung 1:3 gelöst und 30 μ Ci, entsprechend 0,02 μ g pro Tier injiziert.

Glycerin-2-T [Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England] hatte eine spezifische Aktivität

von 750 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$. Die Applikation erfolgte in Äthanol-physiologischer Kochsalzlösung 1:10. Jedes Tier erhielt 30 μCi , entsprechend 0,04 mg Glycerin in 0,5 ml Lösung.

Progesteron und Primobolan [Schering A.G. Berlin] wurden in Sesamöl gelöst. Für die Vorbehandlung mit diesen Hormonen war der Depoteffekt, den ein öliges Lösungsmittel hervorruft, durchaus erwünscht, da eine Dauerwirkung auf den Stoffwechsel hervorgerufen werden sollte. Die Dosis betrug für Progesteron 3mal jeden zweiten Tag 1 mg in 0,5 ml Sesamöl, für Primobolan 14 Tage lang jeden zweiten Tag 10 mg in 0,5 ml Oel.

Thyroxin wurde in physiologischer Kochsalzlösung in einer einmaligen Dosis von 0,1 mg pro Tier verabfolgt. Als tägliche Produktion gibt [42] 5 $\mu\text{g}/100$ g Körpergewicht für Ratten an. Jores [43] gibt den täglichen Bedarf des Menschen mit 0,3 - 0,5 mg Thyroxin an; Schneider [44] bezeichnet den täglichen Bedarf des Kaninchens bei 25°C als 5 μg Thyroxin. Diese Angaben liegen also zwischen 0,2 und 5 μg Thyroxin pro 100 g Körpergewicht und Tag.

Mit 50 $\mu\text{g}/100\text{g}$ Ratte liegen die hier verwendeten Dosen erheblich über diesen Werten.

Nach Jores [43] dauert es Stunden bis Tage, bis die Wirkung des verabreichten Thyroxins deutlich wird. Sie steigt dann bis zu einem Maximum und bleibt über Tage bestehen, bis sie allmählich abklingt. Daher erfolgte keine kontinuierliche Vorbehandlung, sondern eine einmalige Gabe ein bis zwei Tage vor der Injektion des 17 β -Oestradiol-17 α -T.

3. Applikation

Die zu applizierenden Substanzen wurden grundsätzlich intramuskulär ins Hinterbein injiziert. Meli [45] stellte für Steroide eine höhere Wirksamkeit bei subcutaner Injektion als bei oraler Applikation oder intraperitonealer Injektion fest, und nimmt als Ursache

an, daß die Substanzen bei subcutaner Applikation unter Umgehung einer sofortigen Inaktivierung in der Leber direkt in den großen Kreislauf gelangen.

Bei gleichzeitiger Applikation von Progesteron oder Primobolan und Oestradiol wurde an verschiedenen Stellen injiziert (an beiden Beinen). Zwar fanden Edgren et al. [16] keinen Unterschied der antiöstrogenen Wirkung von Progesteron und anderen Steroidhormonen bei getrennter Applikation oder Injektion eines Gemisches mit Oestron, so daß eine Beeinflussung der Resorption nicht angenommen werden muß. Trotzdem wurde die getrennte Applikation beibehalten.

4. Sammeln des Harns

Der Harn wurde in Stoffwechselkäfigen [vgl. S. 9] unter Zusatz von Toluol zur Verhinderung mikrobieller Besiedlung gesammelt. Zur Bestimmung der Gesamtausscheidung von Tritium wurde der Harn mit Äthanol auf ein konstantes Volumen aufgefüllt, um eine homogene Phase zwischen Harn und Toluol herzustellen und eventuell im Toluol angereichertes Steroid mit zu erfassen. Durch Zentrifugieren wurde das Harnsediment und verunreinigende Futterkrümel abgetrennt.

5. Destillation des Harns

Für die Bestimmung des HTO-Gehaltes im Harn wurde dieser destilliert. 0,3 ml Harn wurden mit 0,1 ml n/100 NaOH alkalisiert zur Bindung flüchtiger Carbonsäuren und zur Destillation eingesetzt. Diese erfolgte als Gefrier-trocknung, wie bei Diringier [47] beschrieben.

6. Radioaktivitätsbestimmungen

Die Radioaktivität der Proben wurde im Flüssig-Scintillationszähler "Tri-Carb" der fa. Packard gemessen.

Die Scintillationsflüssigkeit wurde hergestellt aus:

120 g Naphthalin

4,00 g PPO[2,5-Diphenyloxazol]

0,05 g Dimethyl-POPOP [1,4-bis-2-[4-Methyl-5-Phenyl-oxazolyl]-Denzol]

mit Dioxan zu 1 Liter lösen.

Zur Messung wurden eingesetzt:

0,2 ml Harn oder Harndestillat

0,8 ml Wasser

6,5 ml Scintillationsflüssigkeit

Bei der Messung des Ausatmungswassers wurde nur

0,1 ml Ausatmungswasser und

6,5 ml Scintillationsflüssigkeit

eingesetzt; die Zählzelle war dann höher.

Der Nullwert wurde mit destilliertem Wasser und Scintillationsflüssigkeit bestimmt und jeweils von den Meßwerten abgezogen.

Die Zählzelle wurde nach Zugabe eines internen Standards [H₂O in Dioxan] und messen der Differenz der Impulse bestimmt.

$$\text{ZAB } [\%] = \frac{i_{\text{pm}}}{z_{\text{pm}}} \times 100$$

Die Zählzelle betrug, je nach Reinheit des verwendeten Dioxans, etwa 10 % bei Harnmessungen, 10-12 % bei 1 ml Wasser, 14-16 % bei 0,1 ml Wasser.

7. Die Gewinnung des Ausatmungswassers

Im Prinzip ist die Gewinnung des Ausatmungswassers bereits auf Seite 19 beschrieben.

Anfangs wurde die Luft mittels einer Wasserstrahlpumpe durch die Apparatur gesaugt; später wurde Preßluft verwendet. Der entscheidende Vorteil ist, daß bei eventuellen Undichtigkeiten der Apparatur trotzdem keine feuchte Außenluft eindringen und das Ergebnis verfälschen kann. Das Fetten der Schiffe konnte daher unterlassen werden, was den Betrieb vereinfacht. Außerdem entfällt die Geräuschbelästigung.

Der Luftstrom wurde unter "Rotameter"-Kontrolle auf 60 l pro Stunde für ein Tier, 100 l für zwei Tiere eingestellt. Antal und Schleinzner [48] geben für eine entsprechende Anordnung an, daß bei dieser Luftmenge der CO_2 -Gehalt der abströmenden Luft nicht über 1% steigt. Bei theoretischer Berechnung kommt man auf noch niedrigere Werte. Die CO_2 -Exkretion von Ratten beträgt nach Hagemann [49] in trockener Luft 0,031 g pro kg Körpergewicht und Minute. Das entspricht 0,12 g pro Stunde und Ratte, was bei einem Durchstrom von 60 l Luft pro Stunde 0,1 Vol.% ausmachen würde. Dabei bleibt genügend Reserve für ungleichmäßige Ausspülung des CO_2 , ohne daß sich bei den Tieren Vergiftungserscheinungen einstellen könnten.

Zum Trocknen wurde die Luft durch Schwefelsäure geleitet, passierte dann einen Trockenturm mit Kaliumhydroxyd, das außer Wasser vor allem auch mitgerissene Schwefelsäure abfangen sollte, einen weiteren Trockenturm mit CaCl_2 ; schließlich wurde sie durch zwei Kühlfallen geleitet, die in flüssigen Stickstoff tauchten. Dort wurden Reste von Feuchtigkeit aus der Luft entfernt; außerdem boten sie eine Kontrolle für die Trockenheit der Luft. Die vielen Hintereinandergeschalteten Trockenanlagen waren nötig wegen des relativ starken Luftstromes. Es wurde immer darauf geachtet, daß sich in der zweiten Kühlfalle kein Wasser mehr sammelte.

Vor der Passage des Rattenkäfigs wurde die Luft aufgeheizt. Hinter dem Käfig diente eine weitere Kühlfalle zum Auffangen des von den Ratten abgegebenen Wassers. Diese Vorlage konnte alle halbe Stunde gewechselt werden und das gewonnene Wasser nach dem Auftauen zur Messung verwendet werden.

8. Bestimmung der Zyklusphase

Die Zyklusphase wurde an Hand von Vaginalabstrichen, die nach der bei Zarrow [33] angegebenen Methode hergestellt und gefärbt wurden, festgestellt: Mit einer

medizinischen Pipette wurde die Vagina durch mehrmaliges Aufziehen eines Tropfens Wasser oder besser Ringer-Lösung gespült. Dann wurde die Spülflüssigkeit auf einen Objektträger ausgestrichen, getrocknet, mit Methanol fixiert und 30 Minuten nach Giemsa mit Azur-Eosin-Methylenblau 1:20 bei pH 6,4 gefärbt.

Die Auswertung der Präparate (vgl. Abb. 10) erfolgte nach dem auf Seite 27 angegebenen Schema. Der Zyklus eines Tieres wurde jeweils über mehrere Tage verfolgt, ehe es für einen Versuch verwendet wurde, damit die Zyklusphase mit Sicherheit angegeben werden konnte.

9. Berechnung der Oestradiol-Oxidation

a) Zunächst wurde im Gesamtharn und im Harndestillat die in 24 Stunden ausgeschiedene Tritiummenge bestimmt (Versuch II/1-4) und die gesamte Tritiumausscheidung pro Tag in Prozent der injizierten Radioaktivität dargestellt (Abb.2-4; vgl. auch S. 10).

b) In diese Werte gehen jedoch erhebliche Fehlerquellen ein (unterschiedliches Gewicht der Tiere, Schwankungen der Harnmenge; vgl. S.10 und S.14 Tab.3). Deswegen wurde in der Folge die Tritium-Bestimmung als Konzentrationsmessung ausgeführt. Dabei wurde der Tritiumgehalt der Körperflüssigkeit Harn als repräsentativ für die Tritiumkonzentration im Körperwasser angesehen (Abb.5 S.18).

c) Entsprechend wurde in den Versuchen III/2-8 die Tritium-Konzentration im Atemwasser gemessen und durch Berechnung auf das Körpergewicht der Tiere die Gesamtmenge HTO bestimmt (vgl. S.39f.). Sie stellt ein Maß für die Oestradiol-Oxidation an C_{17} dar.

In Abbildung 9 und 11-13 ist also in Abhängigkeit von der Zeit die Radioaktivität pro ml Atemwasser in Prozent der injizierten Tritium-Aktivität dargestellt, wobei als 100% die injizierte Aktivität pro Gramm Ratte gesetzt wurde.

In Tabelle 8 (s.37) wurde außerdem versucht, diese Werte auf Körperwasser umzurechnen, da nur dieses als Verteilungsraum für HTO in Frage kommt (vgl. auch S. 40f.).

VI. Zusammenfassung

Es wurde eine Methode beschrieben, um die Geschwindigkeit der Oestradiol-Oxidation in vivo zu bestimmen. Oestradiol- 17α -T gibt bei der Oxidation zu Oestron Tritium an die Pyridinnucleotide ab, das zu HTO oxidiert wird und im Körperwasser nachgewiesen werden kann.

Bei Ratten wurde nach diesem Prinzip die Oestradiol-Oxidation zunächst durch Messen der HTO-Ausscheidung im Harn nach Injektion von Oestradiol- 17α -T verfolgt; eine entscheidende Verbesserung brachte die Bestimmung der HTO-Konzentration im Ausatemungswasser.

Bei weiblichen Ratten lagen nach acht Stunden 70 % der applizierten Tritium-Aktivität als Wasser vor, d.h. mindestens 70 % des injizierten Oestradiols war zu dieser Zeit zu Oestron oxidiert.

Im Verlauf des Zyklus weiblicher Ratten konnte keine Abhängigkeit der Oestradiol-Oxidationsgeschwindigkeit von der Zyklusphase festgestellt werden.

Vorbehandlung der Tiere mit Progesteron, Primobolan oder Thyroxin bewirkte keine Änderung der Oxidationsgeschwindigkeit.

Nach Progesteron-Vorbehandlung trat keine gesteigerte Ausscheidung von Oestradiol-Metaboliten im Harn auf; ebenfalls kam es zu keiner Veränderung der Oxidationsgeschwindigkeit des Tritiums aus Glycerin-2-T zu HTO.

VII. Literatur

1. K. J. Ryan und L. L. Engel *Endocrinology* 52, 277 [1953]
2. C. L. Gray und F. Bischoff *Amer. J. Physiol.* 180, 279 [1955]
3. G. M. Tomkins *Rec. Progr. Horm. Res.* 12,
125 [1956]
4. M. Levitz, G. P. Condon und
J. Dancis *Endocrinology* 58, 376 [1956]
5. W. H. Pearlman *Acta endocr.* 17, 321 [1954]
6. C. T. Beer und T. F. Gallagher *J. Biol. Chem.* 214, 335 [1955]
7. R. E. Oakey, G. S. Eale und
S. R. Stitch *Biochem. J.* 82, 27 [1962]
8. J. Fishman, H. L. Bradlow
und T. F. Gallagher *J. Biol. Chem.* 235, 3104 [1960]
9. J. Fishman, H. L. Bradlow,
L. Hellman und T. F. Gallagher *Acta endocr.* 37, 57 [1961]
10. J. B. Brown *J. Endocr.* 16, 202 [1957]
11. E. Diczfalusy und
Ch. Lauritzen "Oestrogene beim Menschen"
Berlin-Göttingen-Heidel-
berg 1961
12. S. L. Israel, D. R. Meranze
und C. C. Johnston *Amer. J. med. Sci.* 194, 835 [1937]
13. J. Schiller *Endocrinology* 36, 7 [1945]
14. B. Zondek und J. Sklow *Proc. Soc. Exp. Biol.* 46, 276
[1941]
15. A. A. Sandberg und
W. R. Slaunwhite *J. Clin. Invest.* 36, 1266 [1957]
16. P. Talalay und
H. G. Williams-Ashman *Rec. Progr. Horm. Res.* 16, 1 [1960]
17. J. Jarabak, J. A. Adams,
H. G. Williams-Ashman und
P. Talalay *J. Biol. Chem.* 237, 345 [1962]
18. J. Jarabak, J. A. Adams,
H. G. Williams-Ashman und
P. Talalay *J. Biol. Chem.* 237, 3071 [1962]
19. B. Bloom *J. Biol. Chem.* 235, 857 [1960]
20. H. G. Williams-Ashman In: "Control Mechanisms in
Cellular Processes", Ed.
D. M. Bonner, San Diego, Calif.
1961 S. 167-184

21. R. A. Edgren Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.
94, 537 [1957]
22. A. T. Bever Ann. N. Y. Acad. Sci. 75, 472
[1959]
23. K. L. Yielding, G. M. Tomkins,
J. S. Munday und I. J. Cowley J. Biol. Chem. 235, 3413 [1960]
24. R. D. Heard, W. S. Bauld
und N. M. Joffmann J. Biol. Chem. 141, 709 [1941]
25. B. R. Endahl und
C. D. Kochakian Biochim. Biophys. Acta 54, 15
[1961]
26. R. Moore Health Physics Pergamon
Press 7, 161 [1962]
27. R. C. Thompson J. Biol. Chem. 200, 731 [1953]
28. W. Christ Diplomarbeit FU Berlin 1966
29. E. Kraas Dissertation FU Berlin, noch
nicht veröffentlicht
30. R. Kaiser Klin. Wschr. 33, 15 [1955]
31. K. Engels Diplomarbeit FU Berlin 1966
32. B. F. Stimmel und C. Stealy J. Clin. Endocr. 12, 489 [1952]
33. M. X. Zarrow, J. M. Yochim,
J. L. McCarthy [Eds.] "Experimental Endocrinology"
New York und London 1964
34. T. F. Gallagher In: "Hormonal Steroids"
Eds. L. Martini und A. Pecile
New York und London 1964
S. 103-110
35. H. Breuer und L. Nocke Acta Endocr. 31, 69 [1959]
36. H. Breuer, J. Breuer und
D. Schmährl Z. Krebsforschung 67, 247 [1965]
37. B. Hess und K. Brand In: "Schilddrüsenhormon und
Körperperipherie", 10. Symp.
d. dt. Ges. Endokr. Hrsg. E. Klein
Berlin-Gött.-Heidelberg 1964
38. J. H. Bloch, F. K. Millar,
A. R. Harris, N. J. Berlin
und J. White J. Appl. Physiol. 16, 181 [1961]
39. A. O. Udekwu, D. D. Kozoll
und K. A. Meyer J. Nuclear Med. 4, 60 [1963]
40. Th. Bücher und
M. Klingenberg Angew. Chemie 70, 555 [1958]
41. M. Wenzel Pers. Mitteilung

42. H. M. Rauen [Hrsg.] Biochem. Taschenbuch Bd. 2, 313
Berlin-Gött.-Heidelbg 1964
43. A. Jores "Klinische Endokrinologie"
3. Aufl. Berlin-Gött.-Heidelbg
1949
44. H. Rein und M. Schneider "Einführung in die Physiologie"
des Menschen", 15. Aufl. S. 382
Berlin-Gött.-Heidelbg. 1964
45. A. Meli Endocrinology 72, 715 [1963]
46. R. A. Edgren, I. P. Weinberg, Endocrinology 72, 665 [1963]
T. G. B. Cochran
47. H. Diringer Diplomarbeit FU Berlin 1964
48. J. Antal und R. Schleinzer Pflügers Arch. ges. Physiol.
244, 500 [1941]
49. E. Hagemann und G. Schmidt "Ratte und Maus", Berlin 1960
S. 125
50. C. A. Villee Zit. nach [11], S. 206

Die Arbeit wurde unter der Leitung von
Herrn Dr. rer. nat. M. W e n z e l im
Physiologisch-Chemischen Institut der
Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. E. S c h ü t t e
möchte ich meinen herzlichen Dank aus-
sprechen für die Bereitstellung des
Arbeitsplatzes. Herrn Dr. W e n z e l
bin ich für die Überlassung des Themas
und für wertvolle Anregungen im Verlauf
der Arbeit dankbar.

Herrn Dr. P. E. S c h u l z e
[Schering A.G. Berlin] danke ich für
großzügige Förderung und anregende
Diskussionsbeiträge.

Lebenslauf

Als Tochter des Diplom-Ingenieurs Otto Kleucker und seiner Frau Paula, geb. Stolper, wurde ich am 20. November 1943 in Bernstadt Kreis Oels in Schlesien geboren, wohin meine Mutter mit den vier älteren Geschwistern aus Berlin evakuiert war. Nachdem wir zunächst nach Württemberg geflüchtet waren, kehrten wir 1946 nach Berlin zurück.

1949 wurde ich in Berlin-Siemensstadt eingeschult;

1955 kam ich auf den Wissenschaftlichen Zweig der Carl-Friedrich-von-Siemens-Schule.

1962 Reifeprüfung

1962-1968 Medizinstudium an der Freien Universität Berlin

4.4.1963 Vorphysikum

31.10.1964 Physikum

2.10.1968 Staatsexamen

Am 1.11.1968 werde ich meine Medizinalassistentenzeit in Lauterbach / Hessen beginnen.

